



Universidade de Aveiro
2012

Departamento de Química

**Sónia Pereira
Lopes**

Díades Porfirina-Flavonoide

**Síntese e avaliação como potenciais agentes geradores de
oxigénio singuleto**



Universidade de Aveiro
Ano 2012

Departamento de Química

**Sónia Pereira
Lopes**

Díades Porfirina-Flavonoide

**Síntese e avaliação como potenciais agentes geradores de
oxigénio singuleto**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química com especialidade em Química Orgânica e Produtos Naturais, realizada sob a orientação científica da Doutora Diana Cláudia Gouveia Alves Pinto, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, da Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor Artur Manuel Soares da Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Diana Cláudia Gouveia Alves Pinto

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Margarida Gomes da Silva

Investigadora Auxiliar - REQUIMTE, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

agradecimentos

Aos meus orientadores, Dra. Diana Pinto, Dra. Amparo Faustino e Prof. Dr. Artur Silva, o meu sincero agradecimento pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade dispensada ao longo da realização deste trabalho.

Ao grupo de investigação de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro quero agradecer a ajuda e ensinamentos que de todos recebi sempre que precisei. Agradeço em especial ao José Menezes pela preciosa ajuda e ensinamentos ao longo desta dissertação.

Aos meus amigos, que apesar de serem poucos são os maiores, obrigada pelo acompanhamento e opiniões.

Ao Nuno, o meu verdadeiro companheiro de todos os momentos. Obrigada pelo amor, apoio e paciência ao longo de toda a execução e escrita desta dissertação.

À minha família, em especial aos meus pais por todas as oportunidades que me proporcionaram.

palavras-chave

Flavonoides, Macrociclos Tetrapirrólicos, Aminoação de Buchwald-Hartwig, Díades Porfirina-Flavonoide, Propriedades Fotofísicas.

resumo

Os flavonoides são compostos polifenólicos, que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal. Estes compostos têm vindo a suscitar bastante interesse mediante as importantes atividades biológicas que exibem, nomeadamente atividade anti-inflamatória, anti-oxidante e anticancerígena.

Os macrociclos tetrapirrólicos, como as porfirinas, encontram-se envolvidos em importantes processos biológicos e demonstram a sua versatilidade em diversas áreas como na catálise, na química supramolecular e na medicina.

Uma recente estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos ou o melhoramento de fármacos já existentes, consiste na síntese de compostos com ação dual. Neste contexto e considerando as importantes atividades biológicas exibidas pelos flavonoides e pelas porfirinas, procedeu-se à síntese de novas díades porfirina-flavonoide, acreditando que a combinação destas duas classes de compostos promova um aumento da atividade biológica existente.

A síntese das díades porfirina-flavonoide foi possível através da utilização da reação de aminoação de Buchwald-Hartwig, tendo estas sido obtidas em rendimentos moderados a elevados (31%-91%).

Considerando a potencial aplicação das díades sintetizadas na terapia fotodinâmica (PDT) ou no fotodiagnóstico (PD) de tumores, foram também avaliadas algumas propriedades fotofísicas importantes nomeadamente, o rendimento quântico de fluorescência e a produção de oxigénio singuleto. Algumas das díades apresentam rendimentos quânticos de fluorescência superiores ao derivado precursor, podendo-se considerar que estes compostos surgem como potenciais candidatos a utilizar no PD. Por outro lado, algumas das díades apresentam uma produção de oxigénio singuleto similar ou superior ao derivado precursor, pelo que se apresentam como compostos de interesse a serem utilizados como fotossensibilizadores na PDT de tumores.

keywords

Flavonoids, Tetrapyrrolic Macrocycles, Buchwald-Hartwig amination, Flavonoid-Porphyrin Dyads, Photophysical Properties.

abstract

Flavonoids are polyphenolic compounds widely spread in the plant kingdom. These compounds are becoming the subject of medical research due to a wide variety of biological properties such as anti-inflammatory, antioxidant and anticarcinogenic activities.

Tetrapyrrolic macrocycles, like porphyrins, are known to be involved in many important biological processes and have also proven to be versatile in numerous areas such as catalysis, supramolecular chemistry and medicine.

A recent strategy for the discovery of new drugs or the improvement to already known drug entities, consists in the synthesis of molecules with dual functions. In this context and considering the important biological activities exhibited by flavonoids and porphyrins, we set-up a program aiming the synthesis of new flavonoid-porphyrin dyads, believing that the combination of these two entities may induce an increase in the biological activity.

The synthesis of the dyads was successfully accomplished using the cross-coupling Buchwald-Hartwig amination for the coupling of flavonoid and porphyrin units, being synthesized in moderate to good yields (31% - 91%).

Considering the potential use of the new dyads in PhotoDynamic Therapy (PDT) or Photodiagnosis (PD), we studied some important photophysical properties, namely the fluorescence quantum yields and the ability of these compounds to generate singlet oxygen. Some of the dyads showed higher fluorescence quantum yields than the porphyrin standard, which makes these compounds promising candidates to be used in PD. On the other hand, some dyads showed a higher singlet oxygen generation than the porphyrin standard, making these dyads interesting to use as photosensitizers in PDT of tumors.

ABREVIATURAS

δ - Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (ppm)

ϵ - Coeficiente de absorvidade molar ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

λ - Comprimento de onda

η - Rendimento

Abs. - Absorvância

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

A.U. - Unidades de absorvância (do inglês Absorbance Units)

CoA - Co-enzima A

d - Duplete

dd - Duplo duplete

ddd - Duplo duplete de dupletos

DDQ - 5,6-Diciano-2,3-diclorobenzoquinona

DFiBF - 1,3-Difenilisobenzofurano

DMF - *N,N*-Dimetilformamida

DMSO - Sulfóxido de dimetilo

DPPF - 1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno

equiv. - Equivalente molar

HMBC - Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional, em RMN (do inglês Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)

HSQC - Correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, em RMN (do inglês Heteronuclear Single Quantum Correlation)

HRMS - ESI - Espectrometria de Massa de Alta Resolução acoplada à Ionização por Eletrospray (do inglês High-resolution Mass Spectroscopy - Electrospray Ionization)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

MALDI - Desadsorção por Laser Assistida por Matriz (do inglês Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)

m - Multiplete

min. - Minutos

MW - Microondas (do inglês microwave)

m/z - Razão massa/carga

M⁺ - Ião molecular

NH₂-TPP - 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina

Ni-NH₂-TPP - 2-Amino-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato níquel(II)

Ni-NO₂-TPP - 2-Nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato níquel(II)

Ni-TPP - 5,10,15,20-Tetrafenilporfirinato níquel(II)

NO₂-TPP - 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirina

ODB - *orto*-Dibenzoilbenzeno

PD - Fotodiagnóstico (do inglês Photodiagnosis)

PDT - Terapia fotodinâmica (do inglês Photodynamic Therapy)

ppm - Partes por milhão

PS - Fotossensibilizador (do inglês Photosensitizer)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

RMN de ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de próton

t.a. - Temperatura ambiente

TFA - Ácido trifluoroacético

THF - Tetra-hidrofurano

TLC - Cromatografia em camada fina (do inglês Thin Layer Chromatography)

TMS - Tetrametilsilano

TPP - 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina

***rac*-BINAP** - *rac*-2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo

R_f - Fator de retardamento

UV - Ultravioleta

UV-Vis - Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

Zn-NH₂-TPP - 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinato zinco(II)

ÍNDICE

| CAPÍTULO 1 | FLAVONOIDES 1

1.1. INTRODUÇÃO	3
1.2. ESTRUTURA E NOMENCLATURA	4
1.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	6
1.4. APLICAÇÕES	7
1.5. MÉTODOS DE SÍNTESE	8
1.5.1. MÉTODO DE ALLAN-ROBINSON	9
1.5.2. MÉTODO DE BAKER-VENKATARAMAN	9
1.5.3. REACÇÃO DE WITTIG	10
1.5.4. CONDENSAÇÃO ALDÓLICA/CICLIZAÇÃO OXIDATIVA	11

| CAPÍTULO 2 | MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS 13

2.1. INTRODUÇÃO	15
2.2. ESTRUTURA E NOMENCLATURA	16
2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	17
2.4. APLICAÇÕES	21
2.5. MÉTODOS DE SÍNTESE	22
2.5.1. SÍNTESE DE PORFIRINAS <i>MESO</i> -TETRASSUBSTITUÍDAS SIMÉTRICAS	23

| CAPÍTULO 3 | DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE 27

3.1. INTRODUÇÃO	29
3.2. SÍNTESE DE DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE	33
3.2.1. SÍNTESE DE FLAVONOIDES	33
3.2.2. SÍNTESE DE PORFIRINAS <i>MESO</i> -TETRASSUBSTITUÍDAS	34
3.2.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE	39
3.2.3.1. REACÇÃO DE AMINAÇÃO DE BUCHWALD-HARTWIG	39
3.2.3.2. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO <i>MESO</i>	43
3.2.3.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA	56
3.2.4. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE DESCOMPLEXADAS	67
3.2.4.1. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO <i>MESO</i> DESCOMPLEXADAS	67
3.2.4.2. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADAS	68
3.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE	71
3.3.1. AVALIAÇÃO DA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA	74
3.3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÉNIO SINGULETO	77
3.3.3. AVALIAÇÃO DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA COMPLEXADAS COMO AGENTES INTERCALANTES DE ADN	82

| **CAPÍTULO 4 | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL** **93**

4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	95
4.2. SÍNTESE DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE	96
4.2.1. SÍNTESE DE FLAVONOIDES	96
4.2.2. SÍNTESE DE PORFIRINAS <i>MESO</i> -TETRASSUBSTITUÍDAS	97
4.2.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE	101
4.2.3.1 SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO <i>MESO</i>	101
4.2.3.2. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA	103
4.2.4. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE DESCOMPLEXADAS	106
4.2.4.1 SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO <i>MESO</i> DESCOMPLEXADAS	106
4.2.4.2. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADAS	108
4.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE	111
4.3.1. AVALIAÇÃO DA EMISSÃO POR FLUORESCÊNCIA	111
4.3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGULETO	111
4.3.3. AVALIAÇÃO DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA COMPLEXADAS COMO AGENTES INTERCALANTES DE ADN	112

| **CAPÍTULO 5 | DISCUSSÃO E CONCLUSÃO DOS RESULTADOS** **113**

| **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **117**

| CAPÍTULO 1 | FLAVONOIDES

1.1. INTRODUÇÃO

1.2. ESTRUTURA E NOMENCLATURA

1.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

1.4. APLICAÇÕES

1.5. MÉTODOS DE SÍNTESE

1.5.1. MÉTODO DE ALLAN-ROBINSON

1.5.2. MÉTODO DE BAKER-VENKATARAMAN

1.5.3. REACÇÃO DE WITTIG

1.5.4. CONDENSAÇÃO ALDÓLICA/CICLIZAÇÃO OXIDATIVA

1.1. INTRODUÇÃO

No ano de 1930, dois cientistas húngaros Rusznyak e Szent-Györgyi, isolaram uma substância desconhecida a partir da laranja, que mediante a sua permeabilidade nos vasos capilares foi incluída numa nova classe de vitaminas e designada por Vitamina P. A realização de estudos posteriores vieram a demonstrar que esta nova substância se tratava de um flavonoide, a Rutina (FIGURA 1).^{[1] [2]}

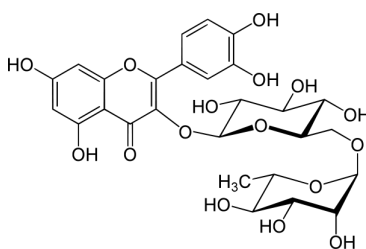


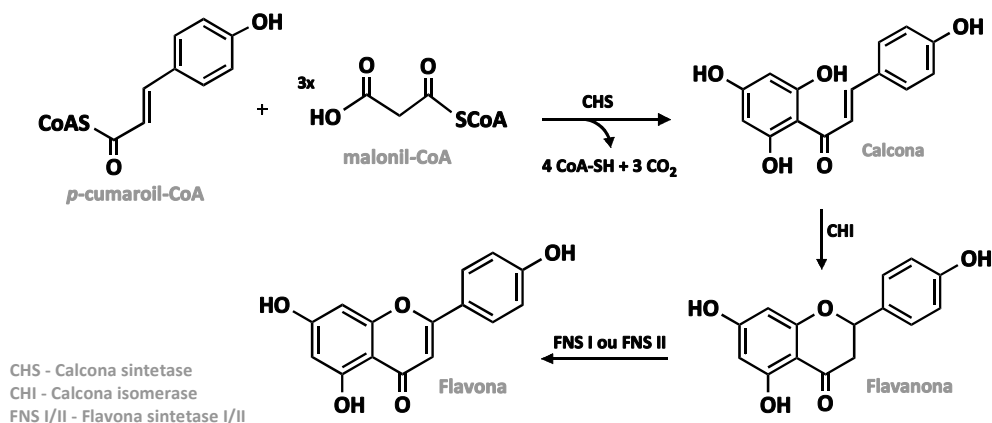
FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA.

Os flavonoides representam um vasto e diversificado grupo de compostos polifenólicos amplamente distribuído pelo Reino Vegetal. Estes compostos são de tal forma abundantes que são considerados como uma das famílias de compostos mais onipresentes dos metabolitos secundários existentes nas plantas.^[3] A abundância e a diversidade dos flavonoides na Natureza encontram-se relacionadas com as importantes funções que estes desempenham no desenvolvimento das plantas. Estes exibem diversas funções quer a nível fisiológico, bioquímico e ecológico, sendo responsáveis pela coloração das flores, pela relação interespécies, pela proteção contra agentes nocivos, pela atividade enzimática e pela regulação de hormonas.^{[4] [5]}

Diversos alimentos que fazem parte da nossa dieta como os frutos, legumes, nozes, vinho, mel e chá, podem apresentar na sua constituição vários tipos de flavonoides.^{[3] [6]} As flavonas podem ser encontradas em frutos, sendo os citrinos laranja e limão as principais fontes, em vegetais como a erva, o aipo e o pimentão verde.^[7]

Quanto à biossíntese dos flavonoides, a sua estrutura provém de duas vias biossintéticas distintas. Inicialmente, ocorre uma etapa crucial, a síntese de uma calcona, a qual resulta da reação de condensação entre três unidades de malonil-CoA que

provêm da via do acetato, com uma unidade de *p*-cumaroil-CoA proveniente da via do ácido xiquímico. Posteriormente, ocorre a conversão da calcona na correspondente flavanona, a qual constituirá a estrutura base para a formação das restantes classes de flavonoides, entre as quais as flavonas (ESQUEMA 1).^{[4] [8]}



ESQUEMA 1. BIOSÍNTESE DE FLAVONOIDES.

1.2. ESTRUTURA E NOMENCLATURA

O termo flavonoide é normalmente utilizado para descrever um conjunto de compostos que apresentam uma estrutura constituída por quinze átomos de carbono, designada por 1,3-difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$), a qual apresenta dois anéis benzénicos ligados por uma ponte de três átomos de carbono (FIGURA 2).^[9] A partir da ciclização desta estrutura são obtidas as diversas classes de flavonoides, que apresentam na sua constituição um núcleo benzo- γ -pirona. Nestas estruturas, a ponte de três átomos de carbono torna-se parte integrante de um anel heterocíclico (C) do tipo pirona (FIGURA 2).^[10]

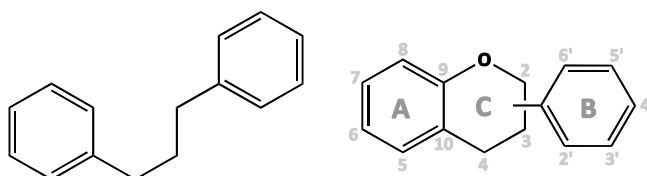


FIGURA 2. ESTRUTURA DO NÚCLEO E ESTRUTURA GERAL DOS FLAVONOIDES COM O SISTEMA DE NUMERAÇÃO SEGUNDO A IUPAC.

A elevada diversidade de flavonoides levou à necessidade de agrupar estes compostos em classes distintas. Assim sendo, os flavonoides podem ser divididos em três classes consoante a posição da ligação do grupo fenilo ao núcleo benzopirano, sendo estes classificados em: flavonoides (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos) e em neoflavonoides (4-fenilbenzopiranos) (FIGURA 3). Estas três classes de compostos partilham geralmente um precursor biossintético comum, a 2'-hidroxicalcona, a qual é constituída por dois anéis benzénicos (A e B) ligados por uma ponte de três átomos de carbono com um sistema carbonílico α,β -insaturado (FIGURA 3).^{[11] [12]}

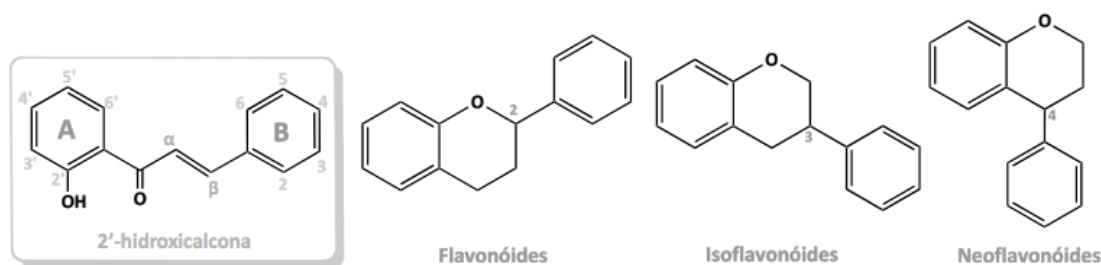


FIGURA 3. ESTRUTURA BASE DO PRECURSOR BIOSINTÉTICO E DAS CLASSES DE FLAVONOIDES.

A classe destes compostos que apresenta uma maior diversidade de estruturas, é a classe dos flavonoides (2-fenilbenzopiranos). Esta classe apresenta-se dividida em diferentes subclasses consoante o grau de oxidação e de saturação do anel heterocíclico C, sendo as subclasses mais representativas as flavanonas, os flavanóis, as flavonas e os flavonóis (FIGURA 4).^[11]

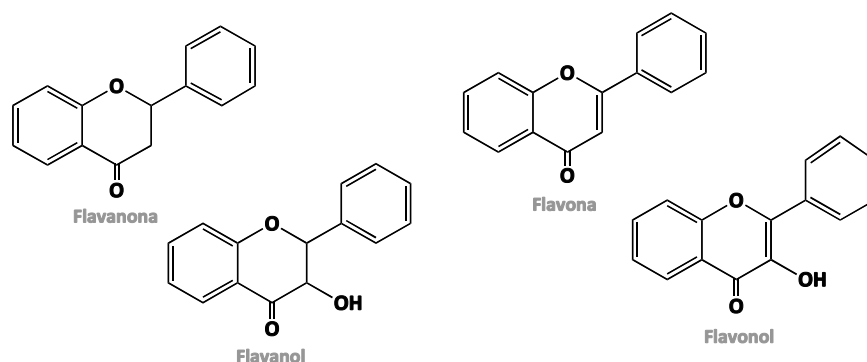


FIGURA 4. ESTRUTURA BASE DAS SUBCLASSES MAIS REPRESENTATIVAS DOS FLAVONOIDES.

Os flavonoides naturais podem ser encontrados na sua forma livre (agliconas), contudo na maioria dos casos estes encontram-se ligados a glicosídeos como a glucose e a ramanose, uma vez que estes facilitam a sua absorção no organismo.^[13]

A ocorrência de compostos halogenados nas plantas não é comum, todavia alguns halo-flavonoides podem ser encontrados em certas algas e fungos. É de salientar as importantes atividades biológicas que os compostos halogenados naturais ou sintéticos podem apresentar nomeadamente como fármacos, fungicidas, herbicidas e inseticidas.^[14]

1.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O núcleo fenilbenzopirano dos flavonoides é suscetível de sofrer diversas reações nomeadamente, hidroxilações, halogenações, prenilações, C- e O-glicosilações e oxidações.^[15] As reações de hidroxilação ocorrem mais frequentemente nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5', podendo também alguns destes grupos hidroxilo serem sujeitos a sofrerem diferentes reações como glicosilação, metilação, acetilação ou sulfonação. Quanto às reações de C-glicosilação, estas ocorrem normalmente nas posições 3 ou 7, sendo a L-ramnose, D-glucose, glucoramnose, galactose ou a arabinose os hidratos de carbono mais comumente associados a estes compostos.^{[16] [17]}

Perante as diversas reações a que este tipo de compostos podem ser sujeitos, podemos-nos deparar com uma enorme diversidade de compostos estruturalmente distintos, os quais terão diferenças significativas em termos de absorção, metabolismo bem como na atividade biológica exibida.^[18] Por exemplo, a adição de hidratos de carbono ou de grupos hidroxilo melhora a solubilidade destes compostos no organismo, ao passo que a adição de grupos metilo torna estes compostos lipofílicos.^[19]

Os flavonoides como pigmentos são responsáveis pela coloração das flores das plantas, apresentando assim uma forte absorção na zona UV-Vis do espectro eletromagnético. Um espectro de UV-Vis típico dos flavonoides é caracterizado pela presença de duas bandas de absorção máxima, uma banda II que surge entre os 220-285 nm e uma banda I que surge entre os 300-400 nm. A existência destas bandas (II e I) deve-se às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel A e do anel B, respetivamente.^[20]

Num espectro de UV-Vis típico de uma flavona, a banda I surge entre os 300-350 nm e a banda II surge entre os 250-270 nm. A presença de um maior número de grupos hidroxilo na estrutura das flavonas, leva ao surgimento de bandas de absorção a comprimentos de onda mais elevados. A metilação ou a glicosilação dos grupos hidroxilo do núcleo dos flavonoides provocam também um desvio batocrómico, principalmente na banda I. Num espectro de UV-Vis típico de uma calcona, a banda I surge a 230-260 nm e a banda II surge 360-390 (FIGURA 5).^{[21] [22]}

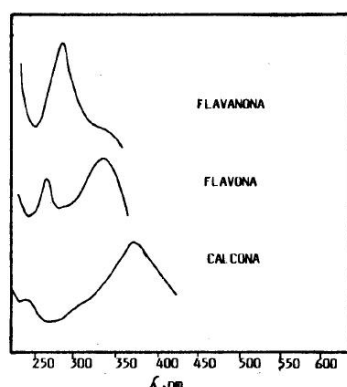


FIGURA 5. ESPECTRO DE UV-VIS DE ALGUNS FLAVONOIDES.^[22]

1.4. APLICAÇÕES

Atualmente, encontra-se cada vez mais presente a ideia de que uma dieta rica em flavonoides, é uma dieta saudável e rica em antioxidantes, tendo estes compostos a capacidade de prevenir doenças associadas ao stress oxidativo^[23], como doenças cardiovasculares^[24], neurodegenerativas^[25] (como a doença de Parkinson e de Alzheimer) e alguns tipos de cancro.^{[26] [27]} Estas doenças são geralmente causadas pela produção excessiva de espécies radiculares livres no organismo como por exemplo, as espécies reativas de oxigénio [ROS - como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (HO^{\bullet}), alcóxido (RO^{\bullet}) e peróxido (ROO^{\bullet})], espécies reativas de nitrogénio [RNS - como o monóxido de nitrogénio (NO^{\bullet}) e dióxido de nitrogénio (NO_2^{\bullet})] e espécies não radiculares (como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2)).

A atividade antioxidante exibida pelos flavonoides, traduz-se na capacidade destes captarem radicais livres, de remover alguns iões metálicos por complexação, de desativar

oxigênio singuleto e de absorver radiações UV. Estes processos permitem que radicais livres se convertam em compostos não radicalares estáveis evitando assim a reação destes com biomoléculas, sendo que o processo de complexação permite evitar a peroxidação lipídica e a catálise oxidativa do ácido ascórbico.^[28]

A relação entre a estrutura/atividade dos flavonoides demonstra ser dependente do número, tipo e posição dos grupos substituintes. Por exemplo, a capacidade antioxidante destes compostos é melhorada se estes apresentarem grupos hidroxilo nas posições 5, 7, 3' e 4', bem como se apresentarem a ligação dupla C2=C3 em conjugação com o grupo carbonilo da posição 4.^[29]

Para além da importante atividade antioxidante desempenhada pelos flavonoides, estes apresentam também variadas aplicações farmacológicas, podendo-se destacar a sua atividade antiviral, antifúngica, antiproliferativa, anti-HIV, anti-inflamatória, antimutagénica, antialérgica, vasodilatadora e antitumoral.^{[30] [31]}

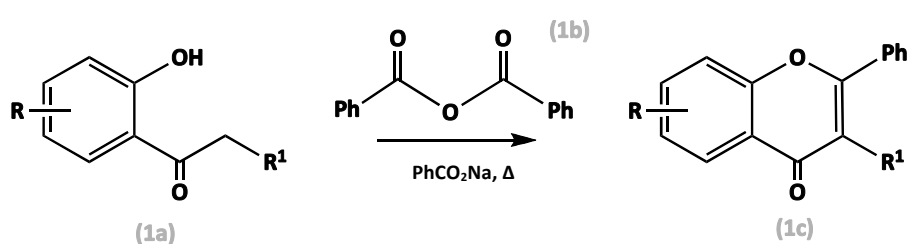
Quanto à atividade antitumoral dos flavonoides, esta parece desenvolver-se através da inibição, reversão ou retardamento da hiperproliferação celular. Estes compostos inibem enzimas que catalisam a formação de espécies reativas de oxigênio (ciclo-oxigenase e lipo-oxigenases), assim como a enzima ornitina descarboxilase que é responsável pela síntese de nucleótidos. Deste modo, existe um impedimento da síntese de ADN que tem como resultado a diminuição da atividade proliferativa das células cancerígenas.^[32] Os flavonoides apresentam-se também capazes de inibir enzimas envolvidas na regulação da proliferação celular como as PTK (proteína tirosina cinase), PCK (proteína cinase C) e PIP3 (fosfoinositídeo 3-cinases).^[33]

1.5. MÉTODOS DE SÍNTESE

Em consequência das importantes atividades biológicas associadas aos flavonoides, ao longo dos anos têm sido desenvolvidas novas e eficientes rotas sintéticas para a obtenção destes compostos. De entre os métodos de síntese de flavonas descritos na literatura, destacam-se os métodos de Allan-Robinson, de Baker-Venkataraman, a reação de Wittig e a condensação aldólica/ciclização oxidativa.

1.5.1. MÉTODO DE ALLAN-ROBINSON

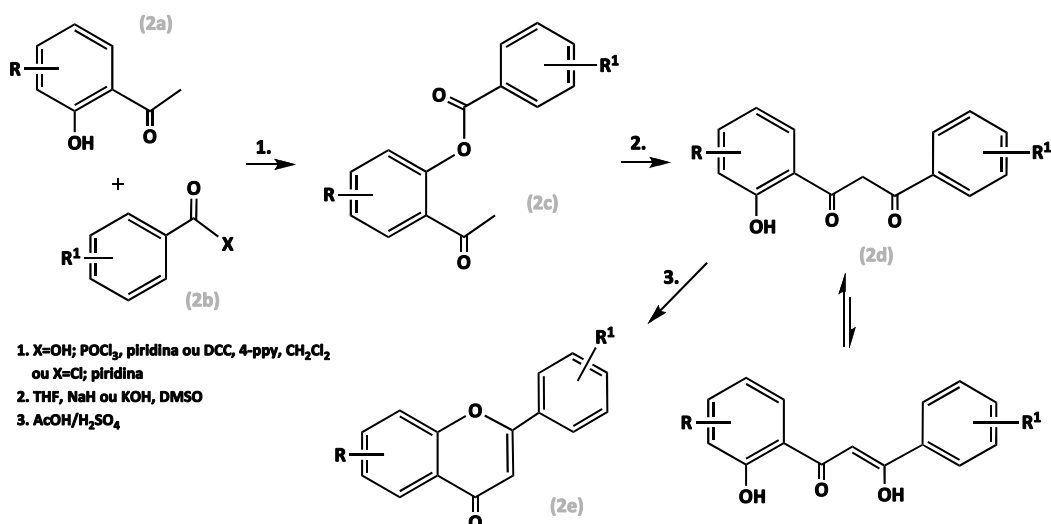
A metodologia de síntese de Allan-Robinson é um dos métodos mais antigos utilizado na preparação de flavonas (**1c**). Este método envolve a condensação de uma 2'-hidroxiacetofenona (**1a**) poli-hidroxilada e/ou poli-metoxilada com um anidrido benzóico (**1b**) e na presença do correspondente benzoato de sódio ou de potássio. Devido às condições severas utilizadas (180 °C e sem uso de solvente) a aplicação deste método é limitada (ESQUEMA 2).^[34]



ESQUEMA 2. SÍNTESE DE FLAVONAS PELO MÉTODO DE ALLAN-ROBINSON.

1.5.2. MÉTODO DE BAKER-VENKATARAMAN

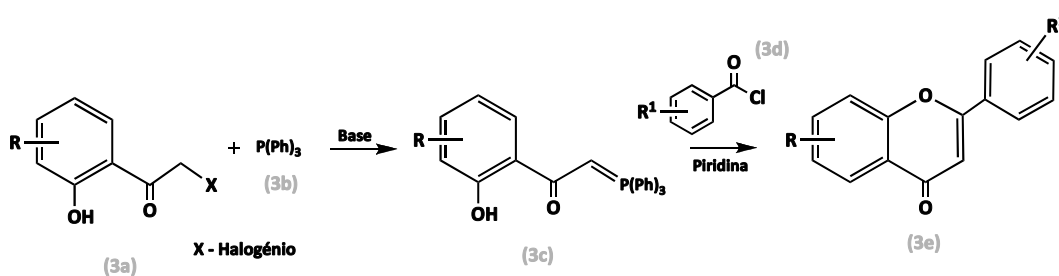
Inicialmente, no método de Baker-Venkataraman ocorre a benzoilação da 2'-hidroxiacetofenona (**2a**), podendo esta reação ocorrer por dois métodos distintos: a adição de um derivado do ácido benzóico (**2b**) à 2'-hidroxiacetofenona (**2a**), na presença de *N,N*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) em diclorometano ou utilizando cloretos de benzoílo em piridina seca. Em ambos os casos é obtido o benzoato de 2-acetilfenilo (**2c**), que por um rearranjo de Baker-Venkataraman em meio fortemente alcalino origina a β-dicetona (**2d**), que se encontra em equilíbrio com a forma enólica. Posteriormente, ocorre a ciclização da β-dicetona (**2d**) na flavona pretendida (**2e**), podendo nesta ciclização serem utilizados vários métodos, sendo os mais comuns aqueles que usam um meio ácido forte, misturas de ácido acético e ácido clorídrico ou ácido acético e ácido sulfúrico, e também ácido *p*-toluenosulfônico ou I₂ em DMSO (ESQUEMA 3).^[35]



ESQUEMA 3. SÍNTESE DE FLAVONAS PELO MÉTODO DE BAKER-VENKATARAMAN.

1.5.3. REACÇÃO DE WITTIG

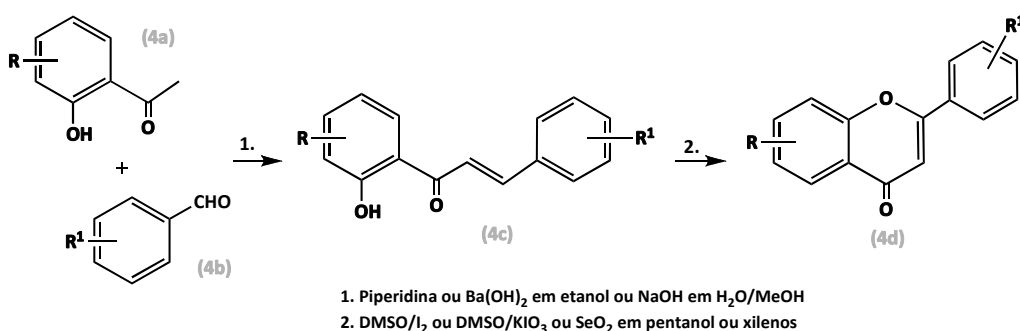
No método síntese de Wittig procede-se a uma reacção de substituição nucleofílica biomolecular entre a 2-bromo-2'-hidroxiacetofenona (**3a**) e a trifenilfosfina (**3b**), que por posterior adição de uma base leva à formação do reagente de Wittig - íleto de fósforo (**3c**). Em seguida, a reacção deste íleto de fósforo com cloretos de benzoílo (**3d**), em piridina, permite a formação da flavona pretendida (**3e**) (ESQUEMA 4).^[36]



ESQUEMA 4. SÍNTESE DE FLAVONAS PELA REACÇÃO DE WITTIG.

1.5.4. CONDENSAÇÃO ALDÓLICA/CICLIZAÇÃO OXIDATIVA

Este método de síntese envolve a sequência de dois passos reacionais, uma condensação aldólica seguida de uma ciclização oxidativa. A condensação aldólica ocorre entre uma 2'-hidroxiacetofenona (**4a**) e um benzaldeído (**4b**), em meio alcalino, levando à formação da 2'-hidroxicalcona (**4c**) correspondente. Esta última sofre em seguida uma ciclização oxidativa em DMSO e na presença de uma quantidade catalítica de iodo, dióxido de selênio ou iodato de potássio, dando origem às flavonas pretendidas (**4d**) (ESQUEMA 5).^[37]



ESQUEMA 5. SÍNTESE DE FLAVONAS POR CONDENSAÇÃO ALDÓLICA/CICLIZAÇÃO OXIDATIVA.

| CAPÍTULO 2 | MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS

2.1. INTRODUÇÃO

2.2. ESTRUTURA E NOMENCLATURA

2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

2.4. APLICAÇÕES

2.5. MÉTODOS DE SÍNTESE

2.5.1. SÍNTESE DE PORFIRINAS *MESO*-TETRASSUBSTITUÍDAS SIMÉTRICAS

2.1. INTRODUÇÃO

Os macrociclos tetrapirrólicos representam uma vasta gama de compostos que se encontram amplamente distribuídos na Natureza, onde desempenham importantes funções em diversos processos biológicos cruciais à Vida.^[38]

No ano de 1930, Hans Fischer foi distinguido com o Prémio Nobel da Química, pelos seus estudos sobre os pigmentos do sangue e das plantas, tendo conseguido caracterizar o grupo Heme (FIGURA 6).^[39] No sangue, o grupo Heme é um complexo de Fe(II) da protoporfirina IX, consistindo no grupo prostético da hemoglobina e da mioglobina, que são responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigénio, respetivamente, em tecidos animais. Este grupo de compostos é também encontrado em enzimas como as peroxidases, que são responsáveis pela oxidação de substratos com peróxido de hidrogénio, e em citocromos, que atuam principalmente como transportadores de eletrões em vários processos biológicos, participando também na biossíntese de esteróides e em processos de desintoxicação.^[40] Nas plantas, um análogo ao grupo Heme encontra-se nas clorofilas, que são pigmentos responsáveis pelo processo de fotossíntese (FIGURA 6). Nestes compostos, o macrociclo tetrapirrólico encontra-se reduzido numa das suas unidades pirrólicas, estando coordenado com o Mg(II) e apresentando diferentes grupos periféricos mediante as funções que desempenham.^[41]

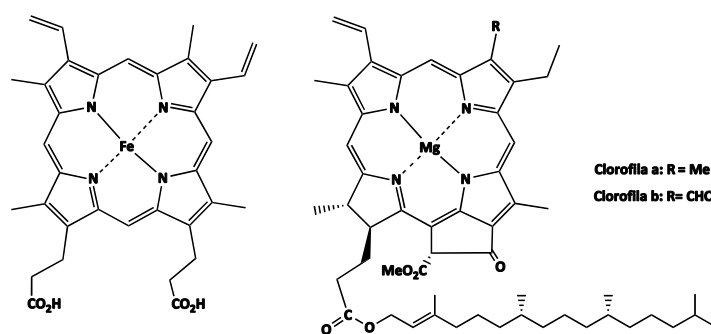


FIGURA 6: ESTRUTURA DO GRUPO HEME E DA CLOROFILA (a e b).

2.2. ESTRUTURA E NOMENCLATURA

Os macrociclos tetrapirrólicos constituem uma vasta gama de compostos constituídos por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por quatro pontes metínicas. A designação de porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas encontra-se relacionada com o grau de insaturação dos anéis pirrólicos assim como a sua posição relativa (FIGURA 7). Particularizando, quando o macrociclo tetrapirrólico se encontra totalmente insaturado (todos os carbonos com hidridação sp^2) este é denominado de porfirina; quando um dos anéis pirrólicos apresenta dois centros sp^3 é denominado de clorina e quando dois dos anéis pirrólicos apresentam dois centros sp^3 este passa a ser denominado de bacterioclorina (centros sp^3 em unidades pirrólicas em posições opostas) ou isobacterioclorina (centros sp^3 em unidades pirrólicas em posições adjacentes).^[42]

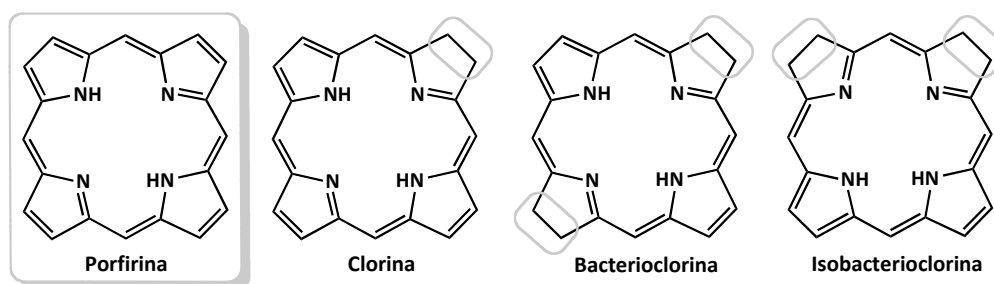


FIGURA 7: ESTRUTURA GERAL DE PORFIRINAS, CLORINAS, BACTERIOCLORINAS E ISOBACTERIOCLORINAS.

Atualmente, existem dois sistemas de nomenclatura que podem ser aplicados aos macrociclos porfirínicos, o sistema proposto por Hans Fischer, também denominado por trivial e o proposto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), que visa a uniformização dos nomes aplicados a este tipo de compostos (FIGURA 8).^[43]

No sistema de nomenclatura proposto por Hans Fischer, este propõe que os quatro anéis pirrólicos sejam designados pelas letras A, B, C e D e as suas posições externas designadas por posições β -pirrólicas e numeradas de 1 a 8; os carbonos pirrólicos quaternários são designados por posições α -pirrólicas e não são numeradas e as pontes metínicas (posições inter-pirrólicas) são geralmente conhecidas por posições *meso* e designadas pelas letras gregas α , β , γ e δ .^{[40] [43]}

No sistema de nomenclatura da IUPAC, todos os átomos de carbono e de nitrogénio do macrociclo são numerados sequencialmente de 1 a 24. Quanto aos átomos de hidrogénio internos, estes podem-se encontrar ligados a qualquer um dos átomos de nitrogénio, porém no caso específico das porfirinas, os átomos de nitrogénio não saturados são os átomos das posições N-21 e N-23.^{[40] [43]}

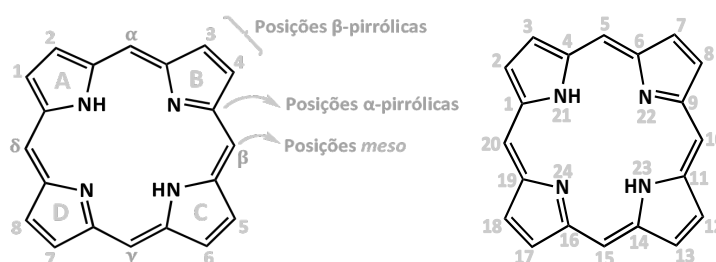


FIGURA 8. SISTEMA DE NOMENCLATURA PROPOSTO POR HANS FISCHER E PELA IUPAC.

2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os macrociclos tetrapirrólicos são compostos aromáticos com um sistema altamente conjugado, podendo estes ser representados por diversas estruturas de ressonância (FIGURA 9).^[44]

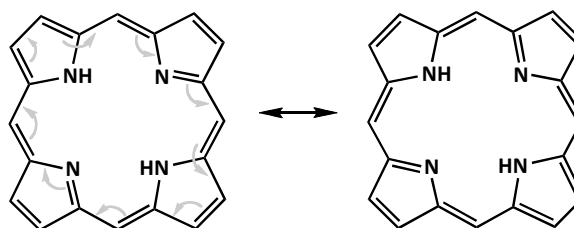


FIGURA 9. ESTRUTURAS DE RESSONÂNCIA DO MACROCICLO PORFIRÍNICO.

O macrociclo porfirínico apresenta uma estrutura planar com vinte e dois eletrões π que obedecem à regra de Hückel para a aromaticidade ($4n+2=22$, $n=5$). No entanto, a aromaticidade é conseguida apenas com dezoito destes eletrões π que se encontram em condições de se deslocalizarem e que continuam a obedecer à regra de Hückel ($4n+2=18$, $n=4$).^[40] Assim, os derivados porfirínicos reduzidos, como as clorinas (20 eletrões π) e as (iso)bacterioclorinas (18 eletrões π), continuam a possuir carácter aromático mesmo apresentando as unidades β -pirrólicas reduzidas.^[45]

A aromaticidade destes compostos pode ser comprovada diretamente por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). No espectro de RMN de ^1H de macrociclos porfirínicos não complexados, os sinais devidos à ressonância dos prótons dos nitrogénios pirrólicos (N-H) encontram-se a desvios à direita do sinal do TMS (δ entre -2 a -3 ppm), encontrando-se portanto bastante protegidos devido à corrente eletrónica existente no interior do macrociclo. Por outro lado, esta mesma corrente eletrónica provoca uma forte desproteção nos prótons externos do macrociclo, fazendo com que os sinais referentes à ressonância dos prótons das posições *meso* e β -pirrólicas surjam na zona aromática, com um desvio químico na região dos 10-11 ppm e dos 8-9 ppm, respetivamente.^[46] Quanto ao espectro de RMN de ^1H dos derivados porfirínicos reduzidos observa-se que a perda de algumas das duplas ligações promove um decréscimo na corrente eletrónica, provocando deste modo um aumento do desvio químico do sinal referente à ressonância dos prótons dos nitrogénios pirrólicos (N-H) e um decréscimo do desvio químico dos sinais referentes à ressonância dos prótons das posições *meso* e β -pirrólicas.^[42]

As porfirinas formam normalmente sólidos cristalinos de cor púrpura. A presença de um sistema altamente conjugado faz com que os macrociclos tetrapirrólicos sejam fortemente corados, apresentando assim bandas típicas de absorção na zona do visível do espectro eletromagnético. Um espectro de UV-Vis típico das porfirinas é caracterizado pela presença de uma banda de absorção característica bastante intensa ($\epsilon \approx 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) entre os 390-420 nm, designada por banda Soret e por duas a quatro bandas com intensidade menor e variável entre os 500-700 nm, designadas por bandas Q (FIGURA 10).^[40] A banda Soret reflete a presença dos 18 eletrões π deslocalizados, responsáveis pelo carácter aromático das porfirinas. Assim, a banda Soret é uma banda bastante característica que surge nos espectros de UV-Vis de todos os macrociclos tetrapirrólicos que contenham um núcleo altamente conjugado.^[42] Relativamente à localização, ao número e à intensidade das bandas Q, estas dependem do grau de substituição da porfirina (posições *meso* e β -pirrólicas), assim como o facto de esta se encontrar ou não complexada com iões metálicos. Quando as porfirinas se encontram complexadas com iões metálicos estas tomam a designação de porfirinatos

metálicos, ocorrendo algumas alterações significativas no espectro de UV-Vis, como a intensificação da banda Soret e a simplificação do número de bandas Q para apenas duas bandas (FIGURA 10).^[40]

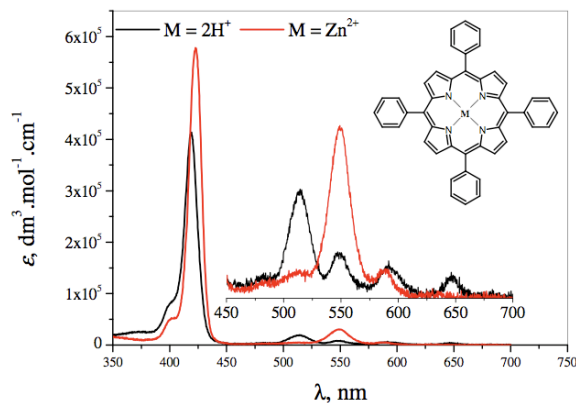


FIGURA 10. ESPECTRO DE UV-VIS DA 5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINA (TPP) (—) E DA 5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINATO ZINCO(II) (ZN-TPP) (—), EM CLOROFÓRMIO.^[47]

Quanto aos espectros de UV-Vis dos derivados porfíricos reduzidos (clorinas e (iso)bacterioclorinas) estes apresentam, tal como as porfirinas, uma banda Soret bastante característica. Porém, revelam algumas diferenças significativas nas bandas Q, o que se traduz nas diferentes colorações exibidas por estes compostos (FIGURA 11).^[48]

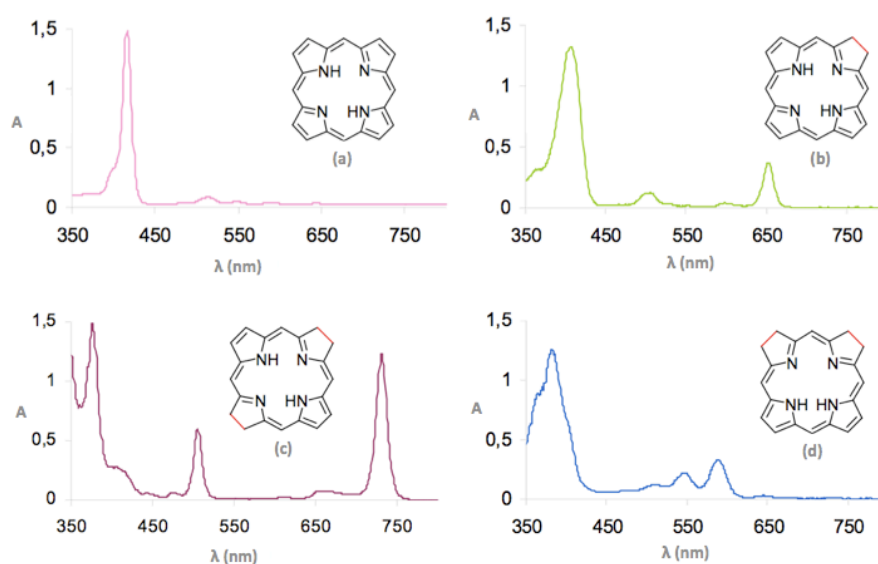


FIGURA 11. ESPECTROS DE UV-VIS TÍPICOS DE MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS MESO-ALQUIL OU -ARIL: (a) PORFIRINAS, (b) CLORINAS, (c) BACTERIOCLORINA E (d) ISOBACTERIOCLORINAS.^[48]

Particularizando, no espectro de UV-Vis das clorinas, compostos de cor verde em solução, a banda com maior comprimento de onda é a banda Q I que surge na região dos 650 nm revelando uma intensidade 10 vezes superior do que a banda correspondente nas porfirinas. Em relação às bacterioclorinas, compostos de cor verde-claro em solução, esta mesma banda Q I surge a 700-750 nm mas com uma intensidade bastante mais forte. Quanto às isobacterioclorinas, estas exibem uma coloração rosa e apresentam a banda Q I a 650 nm com uma intensidade fraca, sendo que as restantes bandas Q surgem entre os 500-600 nm expressando uma intensidade crescente.^[42] Assim, mediante as diferenças observadas nos espectros dos diversos derivados porfíricos reduzidos torna-se possível a sua identificação inequívoca através da espectroscopia de absorção de UV-Vis.

Ainda há a referir que os espectros de UV-Vis das porfirinas existentes apresentam normalmente espectros do tipo *Etio* (IV>III>II>I) contudo, estes compostos podem também apresentar espectros do tipo *Rhodo* (III>IV>II>I), *Oxo-Rhodo* (III>II>IV>I) e *Phylo* (IV>II>III>I).^[42]

Os macrociclos tetrapirrólicos são suscetíveis de sofrer diversas reações, quer no seu interior quer nas suas posições externas.

As porfirinas na sua forma livre têm um comportamento anfotérico, sendo este devido aos grupos N-H presentes no interior do macrociclo que, na presença de uma base são desprotonados formando espécies aniónicas e na presença de um ácido são protonados originando espécies catiónicas (FIGURA 12).^[49]

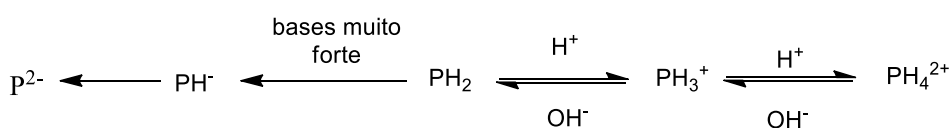


FIGURA 12. COMPORTAMENTO ÁCIDO-BASE DAS PORFIRINAS.

O interior do macrociclo constitui um lugar apropriado para acomodar um ião metálico, o qual se coordena aos quatro átomos de nitrogénio presentes no seu interior, passando o macrociclo a ser designado por metaloporfirina. Geralmente, na Natureza as porfirinas podem ser encontradas complexadas com diversos iões metálicos como o Mg,

Fe, Co, Zn, Ni, Cu e Mn, porém, estas têm demonstrado a capacidade de se complexar com a maioria dos metais presentes na tabela periódica.^[50]

Considerando apenas o macrociclo, as posições externas onde podem ocorrer reações são as posições *meso* e β -pirrólicas, sendo as posições *meso* as mais reativas quando o macrociclo se encontra na sua forma livre. A reação de substituição aromática eletrofílica, reação típica dos compostos aromáticos, apresenta-se como sendo a reação mais comumente utilizada para se proceder à halogenação, nitração, sulfonação, acilação e formilação destes compostos. Estes compostos podem também sofrer reações de oxidação, redução e de cicloadição. Quando o macrociclo se encontra complexado, este sofre alterações no sistema eletrónico π influenciando a reatividade das diferentes posições do macrociclo. Assim, a complexação com metais de baixa eletronegatividade (Mg^{2+} e Zn^{2+}) leva a um aumento da eletronegatividade ativando as posições *meso*, favorecendo portanto as reações com eletrófilos. Por outro lado, a complexação com metais com maior eletronegatividade (Cu^{2+} e Ni^{2+}) levam à ativação das posições β -pirrólicas favorecendo as reações com nucleófilos.^[51]

2.4. APLICAÇÕES

Ao longo dos anos, a consciência de que os macrociclos tetrapirrólicos são compostos com enormes potencialidades, tem levado a que haja uma investigação contínua e cada vez mais aprofundada sobre a sua utilização. São conhecidas inúmeras aplicações nas mais variadas áreas por parte destes compostos, nomeadamente na catálise^[52], química supramolecular, como modelos biomiméticos^[53], sensores químicos^[54], cristais líquidos^[55], células fotovoltaicas^[56] e na medicina.

No que diz respeito às aplicações na medicina, as porfirinas e os seus derivados são utilizados como transportadores artificiais de oxigénio^[57], na esterilização de sangue^[58] e na fotoinativação de micro-organismos^[59] (bactérias, fungos, protozoários e vírus) presentes em infeções, tendo esta última como maior vantagem o facto de não induzir resistência nos micro-organismos contrariamente aos métodos convencionais.^[60] Estes compostos são também utilizados no tratamento da psoríase, da degeneração

macular da retina, da artrite e da arteriosclerose.^{[61]-[63]} Contudo, na medicina estes compostos assumem a sua maior importância como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica e no fotodiagnóstico de tumores.^[64]

O processo envolvido na terapia fotodinâmica para o tratamento de tumores, consiste inicialmente na administração do PS por via oral, tópica ou intravenosa. Após a sua administração é esperado um tempo previamente estabelecido e específico de cada PS, por forma a haver uma retenção seletiva do PS nas células alvo. Estas células são posteriormente irradiadas com luz com um comprimento de onda adequado, havendo formação de espécies citotóxicas (radicais livres e oxigénio singuleto) as quais provocam danos celulares levando à destruição do tumor.^[65] A terapia fotodinâmica apresenta algumas vantagens perante os métodos de tratamento de tumores usualmente utilizados (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), como o facto de se tratar de um processo pouco invasivo e com poucos efeitos secundários associados.^[66]

No fotodiagnóstico, o processo assemelha-se à terapia fotodinâmica, ocorrendo neste caso a absorção da radiação incidente pelo fotossensibilizador havendo a emissão de fluorescência por parte do PS localizado nas células alvo, tornando-se deste modo visível a área afetada pelo tumor.^[42]

2.5. MÉTODOS DE SÍNTESE

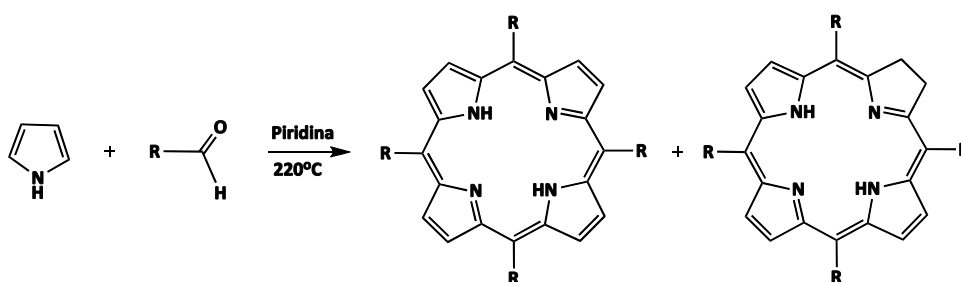
Os macrociclos tetrapirrólicos ao longo dos anos têm demonstrado enormes potencialidades em diversas áreas. Por este facto, têm sido diversos os investigadores que procuram desenvolver novos métodos de síntese deste tipo de compostos, tomando como modelo ou mimetizando os seus correspondentes biológicos. Os estudos desenvolvidos visam não só a sua síntese total mas também a funcionalização e a modificação dos macrociclos, por forma a obter compostos específicos para determinado fim.

Em seguida, são descritos de forma sucinta os principais métodos de síntese desenvolvidos para a obtenção de porfirinas *meso*-tetrassubstituídas simétricas, o tipo de macrociclo que foi utilizado nesta dissertação como reagente de partida.

2.5.1. SÍNTESE DE PORFIRINAS *meso*-TETRASSUBSTITUÍDAS SIMÉTRICAS

As porfirinas *meso*-tetrassubstituídas simétricas são geralmente sintetizadas através de reações de condensação entre o pirrol e um aldeído.

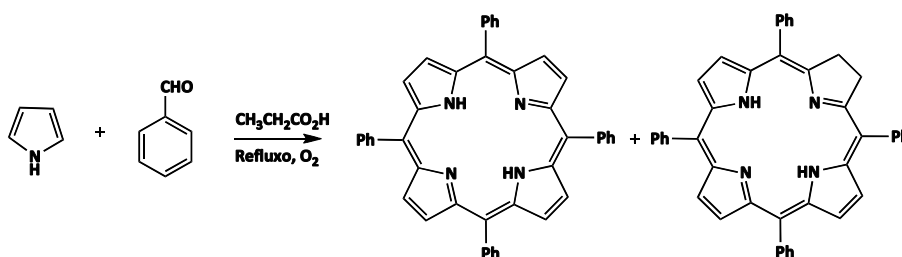
A síntese da primeira porfirina *meso*-tetrassubstituída foi realizada em 1935 por Rothmund.^[67] Este investigador conseguiu sintetizar mais de trinta porfirinas, entre as quais se destaca a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP). O método de síntese proposto consistia no refluxo de pirrol com um aldeído, em piridina, a 220°C, durante 48 horas e sob condições anaeróbicas (ESQUEMA 6).



ESQUEMA 6. MÉTODO DE SÍNTESE DE ROTHMUND.^[67]

Apesar deste método ser bastante simples as condições utilizadas eram drásticas e os rendimentos obtidos bastante reduzidos (na ordem dos 5%). Além disto, as porfirinas sintetizadas surgiam contaminadas com a correspondente clorina cuja separação por técnicas cromatográficas se apresentava bastante complexa.

Na década de 60, Alder *et al.*^[68] propuseram um novo método de síntese tendo em vista a suavização das condições reacionais e a obtenção de melhores rendimentos perante a síntese de Rothmund. Este método, consistia no refluxo de uma mistura de pirrol e benzaldeído em ácido propiónico (141°C), durante 30 minutos e sob condições aeróbicas (ESQUEMA 7).

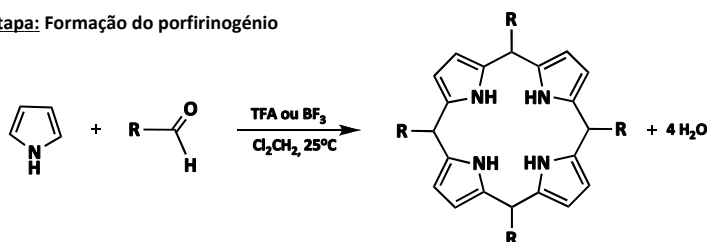
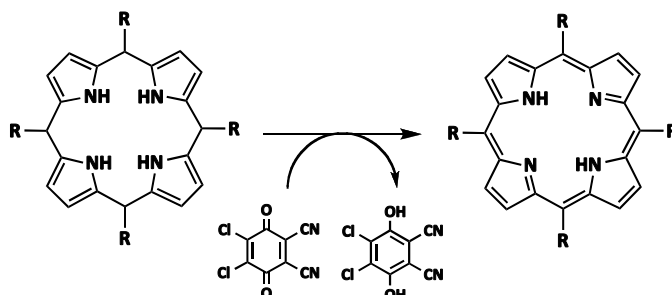


ESQUEMA 7. MÉTODO DE SÍNTESE DA TPP PELO MÉTODO DE ALDER *et al.*^[68]

Com esta nova metodologia, foi possível obter uma variedade de porfirinas *meso*-substituídas partindo de diversos aldeídos, tendo havido um maior interesse nas porfirinas sintetizadas a partir de aldeídos aromáticos, como o benzaldeído e os seus derivados. Este método permitiu também obter rendimentos mais satisfatórios para estas porfirinas, sendo a TPP obtida com um rendimento de 30-40%. No entanto, apesar de haver uma melhoria dos rendimentos as porfirinas sintetizadas continuavam a apresentar-se contaminadas com a correspondente clorina. Mediante este problema, a solução encontrada foi o tratamento posterior da mistura reacional com quinonas, que oxidavam a clorina obtida à respetiva porfirina, não havendo assim a subsequente necessidade de recorrer a métodos de purificação.

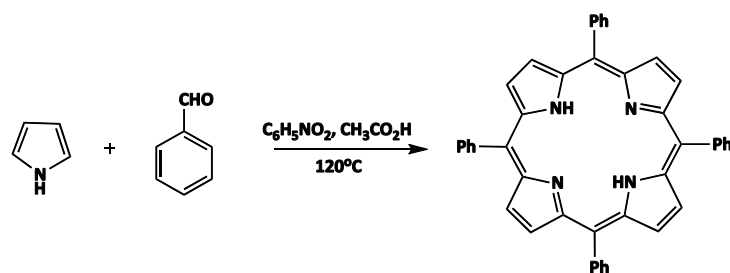
Em 1985, foi proposto um novo método de síntese de *meso*-tetra-alkilporfirinas por Gonsalves *et al.*^[69] Neste novo método, pode-se considerar que a síntese ocorre em duas etapas: na primeira etapa, ocorre a formação do porfirinogénio, o qual é considerado um intermediário estável da reação entre o pirrol e o aldeído sob condições adequadas, sendo este numa segunda etapa oxidado à correspondente porfirina. Esta metodologia consistia portanto, na condensação de pirrol com um aldeído alifático, numa solução de tetracloreto de carbono (CCl₄), na presença de ácido trifluoroacético (TFA), a 60°C, obtendo-se assim o porfirinogénio. Este seria posteriormente oxidado pela adição de um agente oxidante (DDQ ou *p*-cloro-anil) ou por via fotoquímica, à correspondente porfirina, cujo rendimento rondava os 18%.

No ano de 1987, Lindsey *et al.*^[70] propôs uma metodologia análoga à proposta por Gonsalves *et al.*^[69] para a obtenção de porfirinas *meso*-tetra-arilsubstituídas. A síntese do porfirinogénio é conseguida pela reação de condensação entre o pirrol e aldeídos aromáticos, num solvente clorado (CHCl₃ ou CH₂Cl₂), na presença de um catalisador ácido (BF₃, TFA ou BCl₃) e à temperatura ambiente. Em seguida, o porfirinogénio obtido é oxidado pela adição de DDQ ou de *p*-cloroanil, à respetiva porfirina. Com este método, a síntese da TPP utilizando o benzaldeído e pirrol, é conseguida com um rendimento de 35% (ESQUEMA 8).^[70]

1ª etapa: Formação do porfirinogénio**2ª etapa:** Oxidação do porfirinogénio**ESQUEMA 8. SÍNTESE DA TPP PELO MÉTODO DE LINDSEY *et al.***^[70]

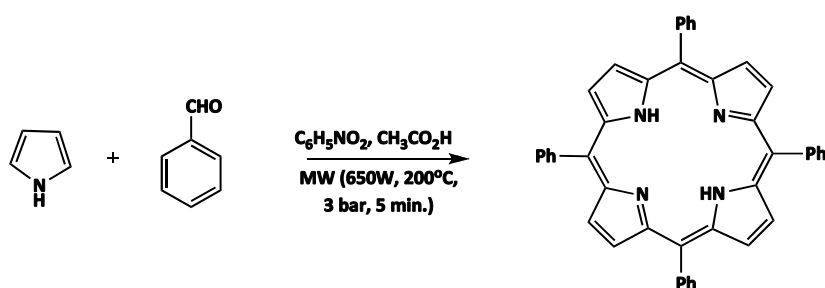
Apesar dos avanços observados na síntese de porfirinas *meso*-tetrassubstituídas pelos métodos de Gonsalves *et al.*^[69] e de Lindsey *et al.*^[70], estes apresentam algumas desvantagens nomeadamente, o facto de se tratarem de métodos bastante dispendiosos devido à utilização de quinonas como agentes oxidantes, o seu processo de purificação ser difícil, bem como pelo facto de serem empregues solventes clorados.

Tendo em vista a utilização de outros agentes oxidantes que não as quinonas, Gonsalves *et al.*^[71] em 1991, desenvolveram um método de síntese, o qual consistia na condensação de pirrol com aldeídos aromáticos, a 120°C, durante 1 hora, numa mistura de nitrobenzeno e ácido acético ou propiónico (**ESQUEMA 9**). Neste método, o nitrobenzeno é utilizado como agente oxidante do porfirinogénio, o qual é oxidado *in situ* à respetiva porfirina. Deste modo, a utilização deste método permite a obtenção de porfirinas *meso*-tetra-arilsubstituídas num único passo, podendo por vezes ser obtidas na sua forma pura por cristalização direta do meio reacional. Atualmente, este é um dos métodos mais usados, sendo possível obter a TPP com um rendimento de 30% mas livre da correspondente clorina.



ESQUEMA 9. MÉTODO DE SÍNTESE DE GONSALVES *et al.*.^[71]

Mais recentemente, foi apresentado pelo grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro^[72] uma otimização do método de síntese anteriormente referido, em que tem como referência as condições de Alder e de Gonsalves e que toma partido da irradiação em micro-ondas para proceder à síntese da TPP. Com esta otimização, a TPP é obtida em 5 minutos e com um rendimento de 35% (**ESQUEMA 10**). Perante a melhoria dos rendimentos, a diminuição dos tempos de reação, assim como a não utilização de agentes oxidantes como as quinonas, este método apresenta-se como uma alternativa eficiente comparativamente com a utilização do aquecimento clássico.



ESQUEMA 10. MÉTODO DE SÍNTESE DA TPP SOB IRRADIAÇÃO EM MICRO-ONDAS.^[72]

| CAPÍTULO 3 | DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE

3.1. INTRODUÇÃO

3.2. SÍNTESE DE DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

3.2.1. SÍNTESE DE FLAVONOIDES

3.2.2. SÍNTESE DE PORFIRINAS *MESO*-TETRASSUBSTITUÍDAS

3.2.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE

3.2.3.1. REAÇÃO DE AMINAÇÃO DE BUCHWALD-HARTWIG

3.2.3.2. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO*

3.2.3.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA

3.2.4. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE DESCOMPLEXADAS

3.2.4.2. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO* DESCOMPLEXADAS

3.2.4.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADAS

3.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

3.3.1. AVALIAÇÃO DA EMISSÃO POR FLUORESCÊNCIA

3.3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGULETO

3.3.3. AVALIAÇÃO DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA COMPLEXADAS ATIVIDADE INTERCALANTE DE ADN

3.1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, tem-se verificado um interesse crescente na procura de novos compostos com potenciais atividades biológicas. Esta procura deve-se, em grande parte, ao surgimento de novos agentes patogénicos e ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte destes agentes.

Na procura de novos fármacos, são diversos os investigadores que tomam como material de partida compostos com estruturas e atividades biológicas já conhecidas, havendo assim um menor gasto no processo de desenvolvimento e uma maior probabilidade de obtenção de um produto com potencial aplicação farmacológica. Neste sentido, surge uma nova estratégia no desenvolvimento de fármacos, a qual consiste na formação de díades, ou seja, a combinação de compostos conhecidos que apresentam importantes atividades biológicas, tendo em vista o desenvolvimento de novos fármacos ou o melhoramento das atividades biológicas já demonstradas.^[73]

Seguidamente, são referidos alguns exemplos específicos que põem em prática a utilização da estratégia anteriormente referida, onde se pode comprovar o sucesso da aplicação desta estratégia.

➤ DÍADES FLAVONA-, INDOL- E FURANO-ESTRADIOL

Ahmed *et al.*^[74] em 2007, procederam à síntese de derivados de flavonas, indóis e de furanos com o estradiol, utilizando para o acoplamento destes compostos a reação de Sonogashira (**FIGURA 13**). Com este estudo foi possível a obtenção de novos compostos a serem utilizados em patologias dependentes de estrogénio uma vez que estes compostos apresentam uma melhor afinidade de ligação para com os recetores de estrogénio.

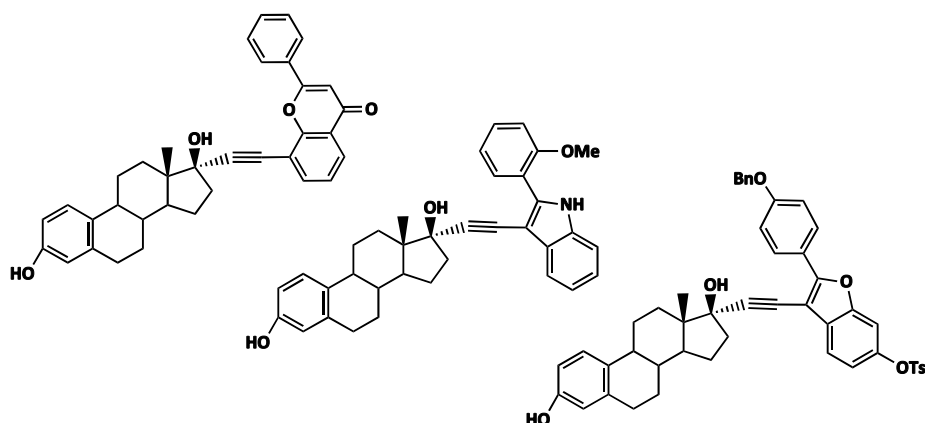


FIGURA 13. ESTRUTURA DAS DÍADES FLAVONA-, INDOL- E FURANO-ESTRADIOL.

➤ DÍADES FULERENO-FLAVONOIDE

Enes *et al.*^[75] em 2009, procederam à síntese de derivados de flavonoides substituídos com dois grupos 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil para posteriormente proceder ao seu acoplamento com o fulereno C_{60} via reações de ciclopropanação (FIGURA 14). O acoplamento de derivados de flavonoides ao fulereno, proporcionou uma melhoria na capacidade antioxidante do fulereno.

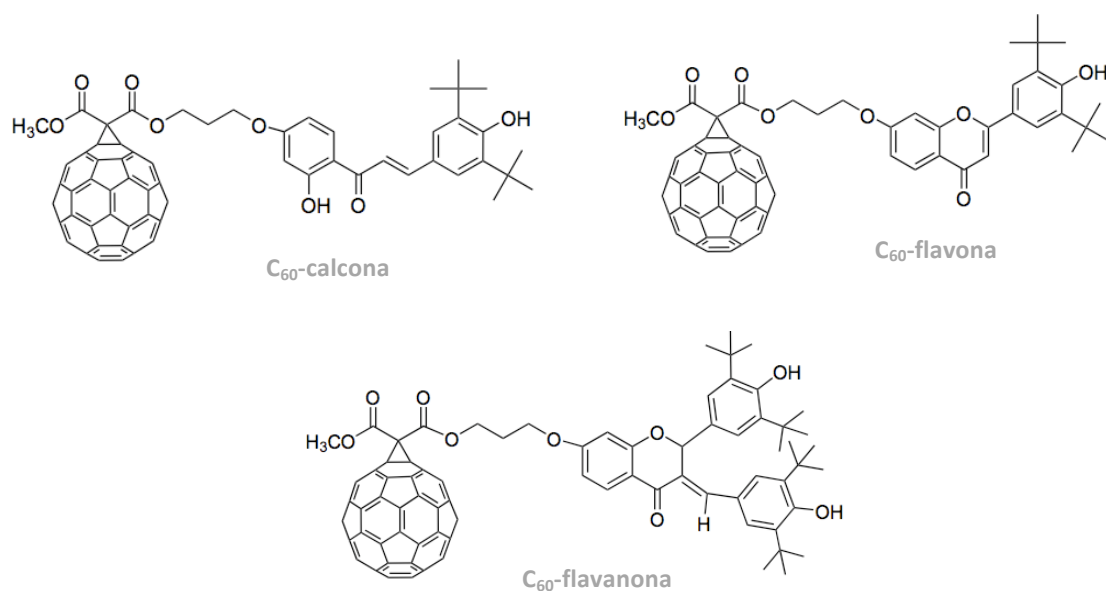


FIGURA 14. ESTRUTURA DAS DÍADES C_{60} -CALCONA, C_{60} -FLAVONA E C_{60} -FLAVANONA.

➤ DÍADES PORFIRINA-CALCONA

Serra *et al.*^[76] em 2009, descreveram a síntese de díades calcona-porfirina pelo acoplamento da calcona (*E*)-3-(4-(benziloxi)fenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona, com as porfirinas, 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina e 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)porfirina (FIGURA 15). Com este estudo, foi possível sintetizar novas díades calcona-porfirina que não apresentam citotoxicidade/fotocitotoxicidade em células COS-7, podendo deste modo serem estes compostos passíveis de vir a ser utilizados no diagnóstico de cancro.

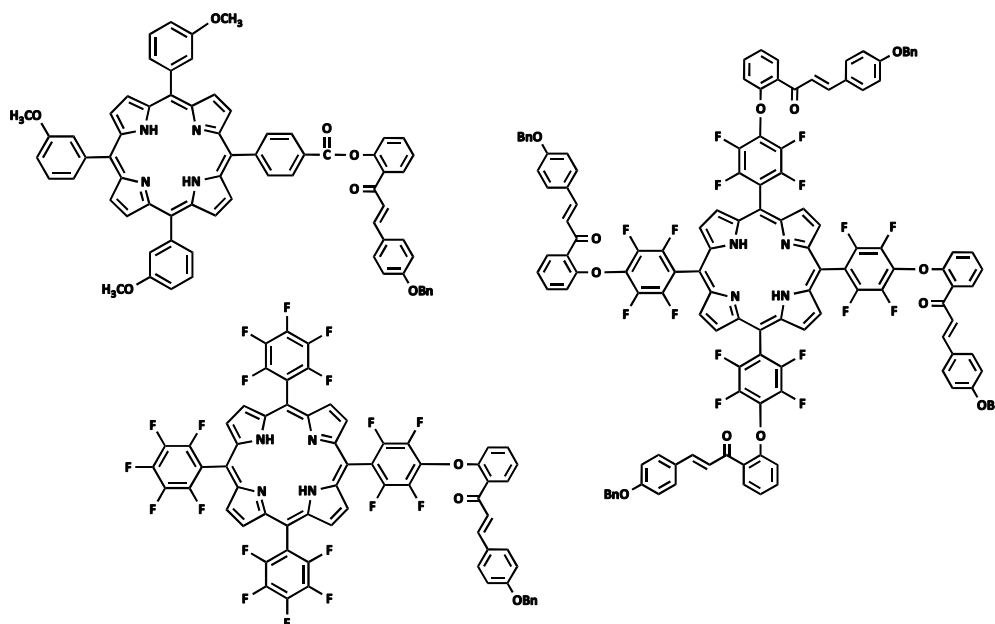


FIGURA 15. ESTRUTURA DAS DÍADES PORFIRINA-CALCONA.

➤ DÍADES CLORINA-FLAVONA

Sousa *et al.*^[73] em 2012, procederam à realização de estudos de reatividade entre porfirinas e íletos de azometino derivados da *N*-cromenilfenilglicina. Neste estudo, foram preparadas três clorinas pelo acoplamento da *N*-[2-(cromen-2-il)fenil]glicina, *N*-[3-(cromen-2-il)fenil]glicina e da *N*-[4-(cromen-2-il)fenil]glicina à 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina via reação de cicloadição 1,3-dipolar (FIGURA 16).

Apesar de não terem sido realizados testes para verificar a potencial atividade dos compostos obtidos, pensa-se que estes compostos possam ser utilizados no fotodiagnóstico/diagnóstico de neoplasias.

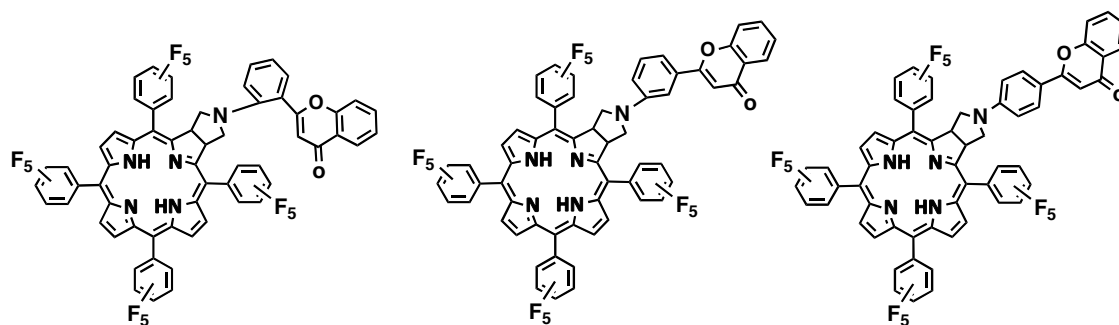


FIGURA 16. ESTRUTURA DAS DÍADES CLORINA-FLAVONA.

Como é possível verificar pelos exemplos anteriormente apresentados, a síntese de díades apresenta-se como uma estratégia eficiente e com um futuro promissor na descoberta de novos compostos mais eficientes. Deste modo, tendo em consideração as importantes atividades biológicas assim como o largo espectro de aplicações associadas aos flavonoides e aos macrociclos tetrapirrólicos, mais em concreto do tipo porfirínico e acreditando num potencial aumento da atividade biológica resultante da combinação das duas unidades porfirina e flavonoide, neste trabalho estabeleceram-se dois objetivos:

OBJETIVO I.

Sintetizar díades porfirina-flavonoide, utilizando para o acoplamento das duas unidades a reação de aminação de Buchwald-Hartwig.

OBJETIVO II.

Avaliar a atividade das díades porfirina-flavonoide sintetizadas, procedendo-se à análise de propriedades fotofísicas como a fluorescência e a produção de oxigénio singuleto, tendo em vista a sua potencial aplicação na terapia fotodinâmica e/ou em fotodiagnóstico.

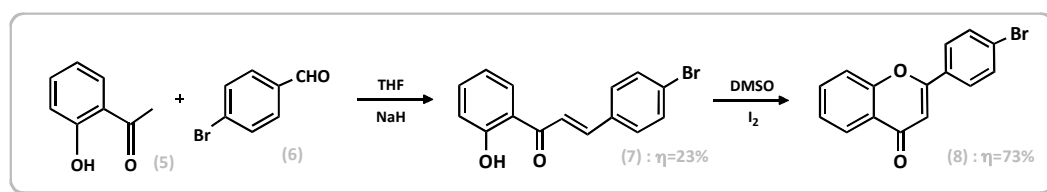
Perante os objetivos definidos para a realização deste trabalho, este capítulo será dividido em duas partes. Na primeira parte, serão discutidas as estratégias de síntese utilizadas para a obtenção dos compostos de partida, ou seja, os flavonoides e as porfirinas necessárias para a preparação das díades, bem como a síntese das díades porfirina-flavonoide pretendidas. Na segunda parte, serão apresentados os estudos realizados das propriedades fotofísicas como a fluorescência e a produção de oxigénio singuleto das díades porfirina-flavonoide sintetizadas.

3.2. SÍNTESE DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

Considerando o **OBJETIVO I**, neste trabalho pretendeu-se sintetizar díades porfirina-flavonoide, tendo-se preparado quatro díades distintas: duas díades do tipo porfirina-calcona e duas díades do tipo porfirina-flavona. Este trabalho teve início pela síntese dos flavonoides e das porfirinas necessárias à preparação das díades, seguida da síntese das díades do tipo porfirina-flavonoide pretendidas.

3.2.1. SÍNTESE DE FLAVONOIDES

Os flavonoides utilizados na síntese das díades pretendidas foram a calcona (*E*)-3-(4-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona, também designada por **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** e flavona 2-(4-bromofenil)-4*H*-cromen-4-ona designada por **4'-BROMOFLAVONA (8)**. A preparação destes dois flavonoides foi conseguida segundo a rota sintética que se encontra apresentada no **ESQUEMA 15**.



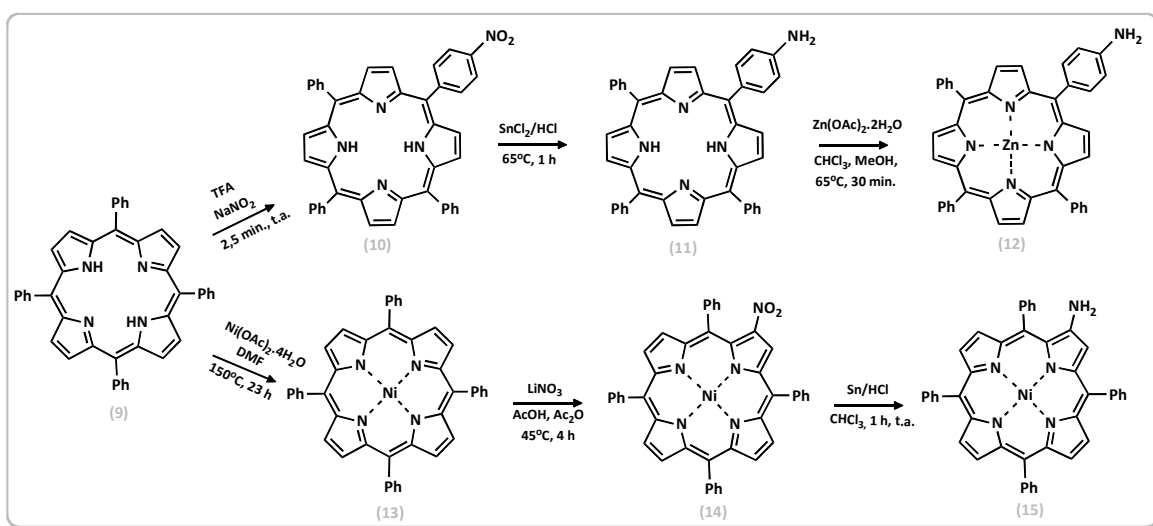
ESQUEMA 15. SÍNTESE DA 4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7) E DA 4'-BROMOFLAVONA (8).

Esta síntese foi conseguida segundo o método de síntese descrito na secção 1.5.4.

- **CONDENSAÇÃO ALDÓLICA/CICLIZAÇÃO OXIDATIVA**, o qual envolve a sequência de dois passos reacionais. Inicialmente, procede-se à síntese da **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)**, através de uma condensação aldólica entre a 2'-hidroxiacetofenona (5) e o 4-bromobenzaldeído (6), em THF seco e na presença de hidreto de sódio, o qual é suficientemente forte para captar o próton ácido da acetofenona e dar início à reação. Em seguida, procede-se a uma ciclização oxidativa da calcona anteriormente obtida, pela adição de uma quantidade catalítica de iodo, em DMSO e sob temperatura elevada, formando-se a **4'-BROMOFLAVONA (8)** pretendida.

3.2.2. SÍNTESE DE PORFIRINAS MESO-TETRASSUBSTITUÍDAS

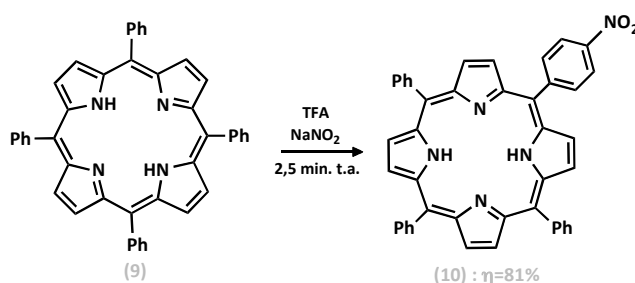
Os macrociclos porfirínicos utilizados na síntese das díades pretendidas foram o 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) - **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** e o 2-amino-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóníquel(II) - **Ni(II)-NH₂-TPP (15)**. No **ESQUEMA 16** encontra-se apresentada a rota sintética seguida para a obtenção das duas porfirinas referidas.



ESQUEMA 16. ROTA SINTÉTICA PARA A PREPARAÇÃO DAS PORFIRINAS (12) E (15).

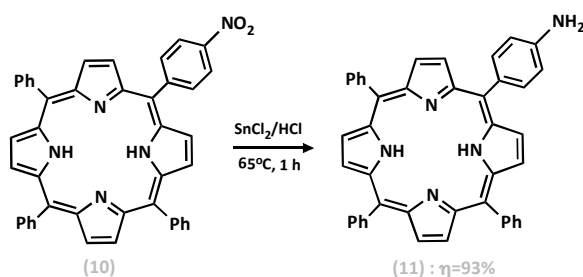
Como podemos verificar pelo **ESQUEMA 16**, ambas as porfirinas pretendidas foram sintetizadas a partir da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina - **TPP (9)**, a qual foi obtida através da condensação de pirrol com o benzaldeído na presença de ácido acético glacial e nitrobenzeno. A mistura é aquecida a 120 °C e dada como terminada ao fim de 1 hora. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, é adicionado metanol à mistura reacional obtendo-se diretamente a **TPP (9)** por cristalização. A escolha da **TPP (9)** como porfirina de partida, prende-se com o facto de se tratar de uma porfirina simétrica obtida em bons rendimentos considerando os rendimentos habituais para a obtenção de macrociclos tetrapirrólicos e a qual pode sofrer funcionalização quer nas posições β -pirrólicas quer no fenilo das posições *meso*. Assim, a síntese das duas porfirinas pretendidas **(12)** e **(15)** envolveu a funcionalização da **TPP (9)**, inserindo-se grupos amino nas posições *meso* e β -pirrólicas desta porfirina, os quais são necessários para a reação de acoplamento entre as unidades flavonoide e porfirina.

A síntese da **Zn(II)-NH₂-TPP (12)**, envolveu numa primeira fase a nitração da **TPP (9)** por introdução do grupo nitro na posição *para* do grupo fenilo em posição *meso*. Para tal, dissolveu-se a **TPP (9)** em ácido trifluoroacético e adicionou-se nitrito de sódio, deixando-se a reação sob agitação magnética, à temperatura ambiente durante 2,5 minutos. Durante este período ocorre uma substituição aromática eletrofílica pelo ataque eletrofílico do macrociclo porfirínico ao ião nitrilo havendo a formação da 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirina - **NO₂-TPP (10)** com um rendimento de 81% (**ESQUEMA 17**).



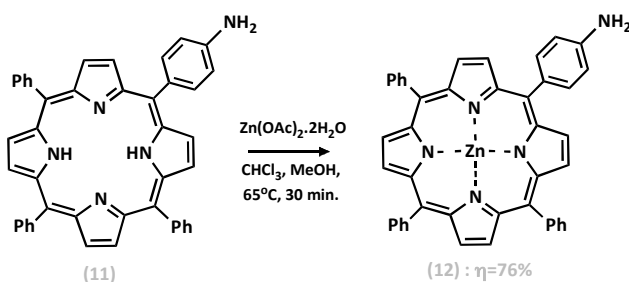
ESQUEMA 17. SÍNTESE DA PORFIRINA 5-(4-NITROFENIL)-10,15,20-TRIFENILPORFIRINA **(10)**.

Uma vez sintetizada a porfirina nitrada, a **NO₂-TPP (10)**, procedeu-se à sua redução pela adição de cloreto de estanho di-hidratado e ácido clorídrico. A mistura foi mantida sob agitação magnética e a 65 °C tendo sido dada por terminada ao fim de 1 hora. Posteriormente, procedeu-se à sua purificação por coluna de sílica gel utilizando uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:1), sendo em seguida a 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina - **NH₂-TPP (11)** sido obtida por cristalização com um rendimento de 93%. (**ESQUEMA 18**).



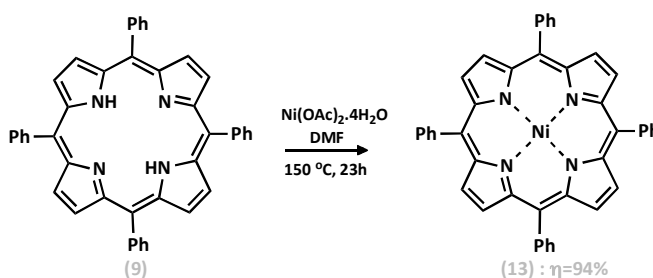
ESQUEMA 18. SÍNTESE DA PORFIRINA 5-(4-AMINOFENIL)-10,15,20-TRIFENILPORFIRINA (11).

A síntese da porfirina com um grupo amino na posição *meso* foi conseguida como pretendido, contudo, a utilização desta porfirina na sua forma livre nas condições de aminação de Buchwald-Hartwig (reação catalizada por paládio) levaria à sua complexação com o paládio, o que seria de todo inconveniente. Assim sendo, procedeu-se à complexação da **NH₂-TPP (11)** com zinco(II), pela adição de acetato de zinco di-hidratado a uma solução de **NH₂-TPP (11)** em clorofórmio/metanol (3:1), a 65 °C. A reação foi dada por terminada ao fim de 30 minutos, pelo que se procedeu posteriormente à sua lavagem com água destilada e extração com clorofórmio. Após a remoção dos solventes, o resíduo obtido foi cristalizado em metanol, tendo-se conseguido obter a **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** na sua forma pura com um rendimento de 76% (**ESQUEMA 19**).

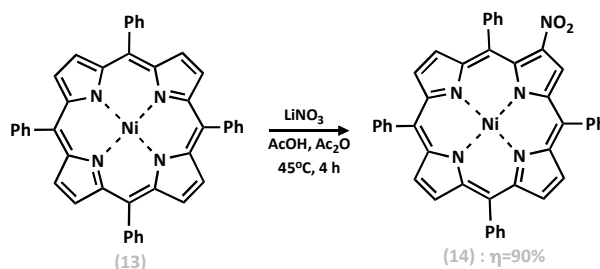


ESQUEMA 19. SÍNTESE DO PORFIRINATO 5-(4-AMINOFENIL)-10,15,20-TRIFENILPORFIRINATOZINCO(II) (12).

Para a síntese da **Ni(II)-NH₂-TPP (15)**, inicialmente procedeu-se à complexação da porfirina de partida **(9)** com o níquel(II), por forma a haver a ativação da posição β-pirrólica como pretendido. Esta reação de complexação foi conseguida pela adição de acetato de níquel(II) tetra-hidratado em DMF, sendo a reação mantida sob agitação magnética, a uma temperatura de 150 °C, durante 23 h. Findo este período, a mistura reacional foi arrefecida até à temperatura ambiente sendo em seguida adicionado gelo o que permitiu a precipitação do material porfirínico. Após filtração, o precipitado foi dissolvido em clorofórmio e purificado por uma coluna de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo e tolueno (1:1), obtendo-se o 5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóníquel(II) - **Ni(II)-TPP (13)** com um rendimento de 94% (**ESQUEMA 20**).

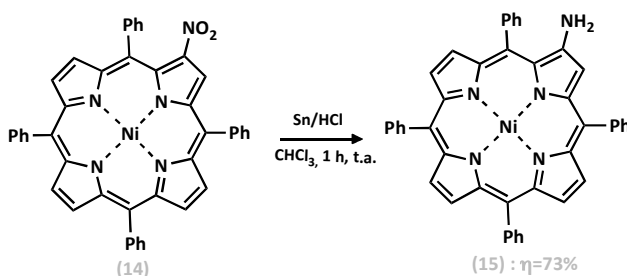
**ESQUEMA 20. SÍNTESE DO PORFIRINATO 5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINATÓNÍQUEL(II) (13).**

Uma vez obtida a porfirina complexada, procedeu-se à sua nitração introduzindo-se o grupo nitro na sua posição 2. Para tal, a porfirina **Ni(II)-TPP (13)** e nitrato de lítio foram dissolvidos numa mistura de ácido acético e anidrido acético, sendo esta solução mantida a 45 °C e agitação magnética durante 4 horas. O término da reação seguiu os procedimentos habituais de neutralização, lavagem, extração e secagem da fase orgânica. Após a evaporação do solvente, o resíduo obtido foi purificado recorrendo a uma coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:1), obtendo-se o 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóníquel(II) - **Ni(II)-NO₂-TPP (14)** por cristalização em bons rendimentos (90%) (**ESQUEMA 21**).



ESQUEMA 21. SÍNTESE DO PORFIRINATO 2-NITRO-5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINATONÍQUEL(II) (14).

Uma vez obtido o derivado nitrado, este foi convertido por redução no correspondente derivado amínico **Ni(II)-NH₂-TPP (15)**. Os complexos metálicos de 2-nitroporfirinas são normalmente reduzidos quantitativamente aos correspondentes 2-aminoporfiratos. No entanto, observa-se uma tendência para estes se decomporem ao fim de alguns dias. Para proceder a esta reação de redução, foi adicionado à **Ni(II)-NO₂-TPP (14)** estanho em pó e ácido clorídrico. A reação foi mantida num balão fechado à temperatura ambiente e sob agitação magnética intensa. O controlo por TLC permitiu dar a reação por terminada ao fim de 1 h. Esta foi em seguida arrefecida e então filtrada por uma pequena coluna de Celite®-545 por forma a eliminar o excesso de estanho, sendo o material porfirínico retomado com clorofórmio. Posteriormente, a mistura reacional foi neutralizada com hidróxido de sódio, lavada com água destilada, extraída com solvente orgânico, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. O resíduo obtido foi retomado em clorofórmio e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando tolueno como eluente. Por fim, a sua cristalização em éter de petróleo permitiu obter a **Ni(II)-NH₂-TPP (15)** com um rendimento de 73% (ESQUEMA 22).



ESQUEMA 22. SÍNTESE DO PORFIRINATO 2-AMINO-5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINATONÍQUEL(II) (15).

3.2.3. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE

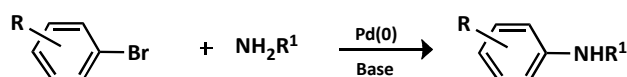
Uma vez sintetizadas as unidades flavonoide e porfirina necessárias, procedeu-se à preparação das díades do tipo porfirina-flavonoide pretendidas. Para proceder ao acoplamento entre as duas unidades, recorreu-se como já referido à reação de aminação de Buchwald-Hartwig. A escolha desta reação prende-se com o facto de esta apresentar um procedimento experimental simples e os rendimentos serem geralmente elevados.

Seguidamente, será feita uma pequena abordagem sobre a reação de aminação de Buchwald-Hartwig, a qual neste trabalho se apresentou fundamental na síntese das díades do tipo porfirina-flavonoide pretendidas.

3.2.3.1. REAÇÃO DE AMINAÇÃO DE BUCHWALD-HARTWIG

A utilização do paládio como catalisador em síntese Orgânica tem demonstrado, ao longo dos anos, ser uma mais valia no que diz respeito à formação de ligações carbono-carbono (C-C) ou carbono-heteroátomo (C-O/-N/-S).

Em 1985, Buchwald *et al.*^[77] e Hartwig *et al.*^[78] publicaram, individualmente, uma reação catalizada por paládio, na presença de uma base, que envolvia brometos de arilo e aminas primárias e secundárias, a qual resultou na formação de uma ligação carbono-nitrogénio (C-N) (ESQUEMA 23).

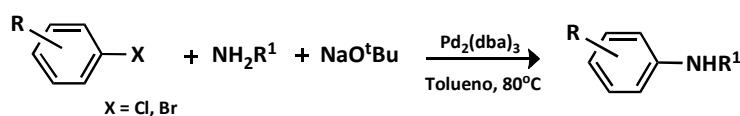


ESQUEMA 23. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO DE BUCHWALD-HARTWIG.^{[77][78]}

Inicialmente, foram utilizados ligandos monodentados para coordenar com o paládio, tendo sido a fosfina terciária $\text{P}(\text{o-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4)_3$ o ligando que permitiu a obtenção de melhores resultados. A utilização de aminas secundárias nesta reação permitiu a obtenção de produtos de reação em bons rendimentos, porém quando foram usadas aminas secundárias com substituintes alquilo primários o produto obtido foi uma imina resultante da eliminação H- β . Quando aminas primárias eram utilizadas os rendimentos

obtidos eram baixos, principalmente quando os brometos de arilo usado não apresentavam substituintes nas posições *orto* e *para*.^[79]

Posteriormente, perante esta situação, Buchwald e Hartwig desenvolveram novas metodologias recorrendo à utilização de ligandos de fósforo bidentados. Assim sendo, Buchwald *et al.*^[80] propuseram o uso do ligando 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo (BINAP) (FIGURA 17) para coordenar com o paládio, na presença de *terc*-butóxido de potássio, tendo-se verificado um aumento significativo do rendimento (ESQUEMA 24).



ESQUEMA 24. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DE BUCHWALD *et al.*.^[80]

Quanto a Hartwig^[79] e os seus investigadores, estes propuseram a utilização do ligando 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (DPPF) (FIGURA 17) para coordenar com o paládio, obtendo-se bons resultados nas reações com aminas primárias e haletos de arilo deficientes em eletrões (ESQUEMA 25).

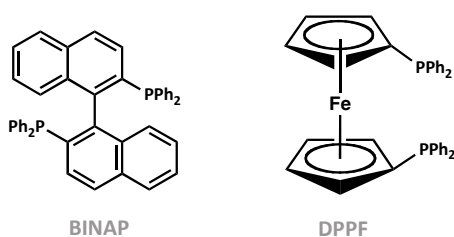
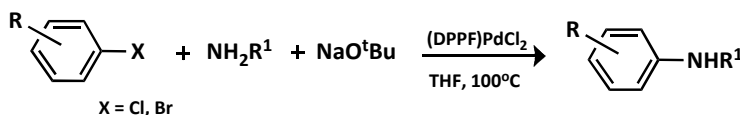


FIGURA 17. ESTRUTURA DO BINAP E DO DPPF.



ESQUEMA 25. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DE HARTWIG *et al.*.^[79]

Tendo o ligando um papel fundamental no sucesso da reação de aminação de Buchwald-Hartwig, pode-se dizer que o ligando mais adequado a utilizar deverá ser aquele que aumenta a densidade eletrónica do paládio de modo a facilitar a adição oxidativa e ao mesmo tempo proporcionar o impedimento adequado para permitir a

eliminação redutiva face à eliminação H-β.^[81] Atualmente, dos ligandos bidentados existentes o BINAP e o DPPF são os ligandos de eleição. De entre os catalisadores de paládio os mais usualmente utilizados como fonte de Pd(0) são o Pd(dba)₂ e o Pd(dba)₃ e como fonte de Pd(II), o Pd(OAc)₂, o Pd(acac)₂ ou o PdCl₂. Quanto às bases, as que mais comumente surgem são duas bases fortes, o *terc*-butóxido de sódio (NaO^tBu) e o *terc*-butóxido de potássio (KO^tBu), as quais permitem não só a desprotonação da amina como apresentam solubilidade nos solventes normalmente utilizados, como o tolueno, éter dimetílico, THF ou dioxano.^[81]

Seguidamente, é apresentado um ciclo catalítico genérico da reação de aminação de Buchwald-Hartwig e representativo do acoplamento entre as unidades flavonoide e porfirina (FIGURA 18).

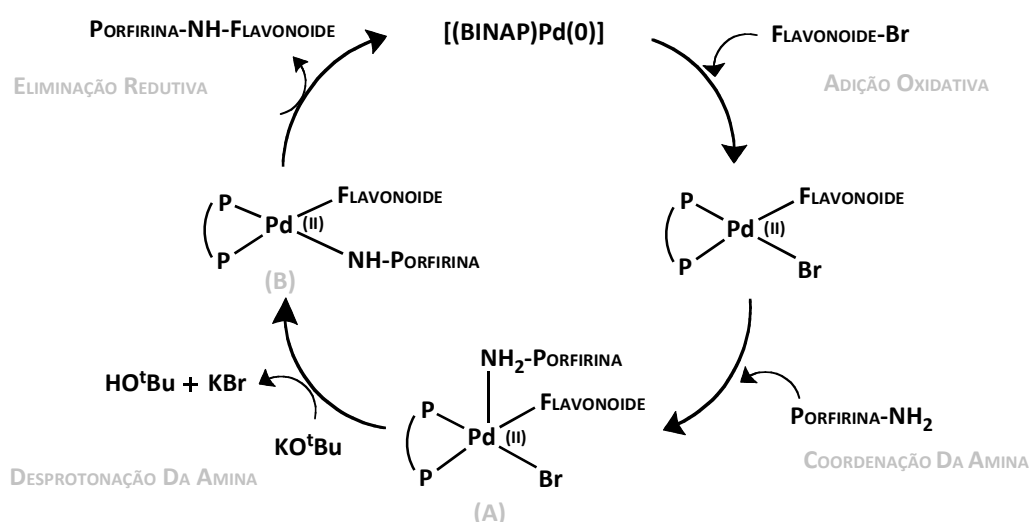
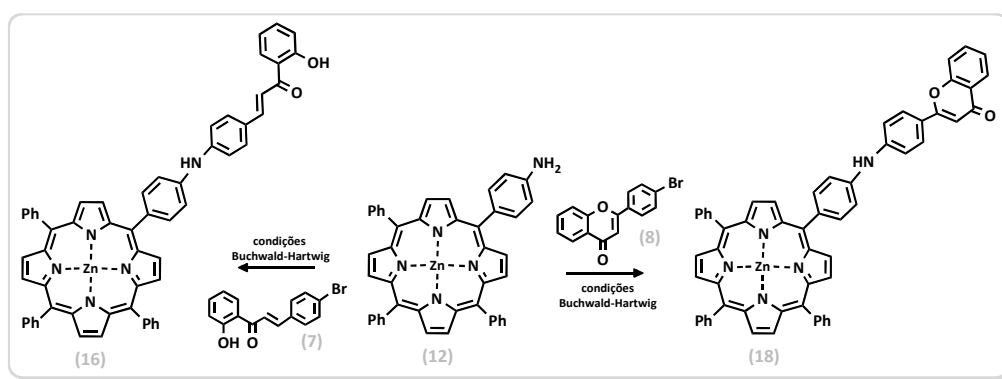


FIGURA 18. REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DO CICLO CATALÍTICO DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO DE BUCHWALD-HARTWIG.

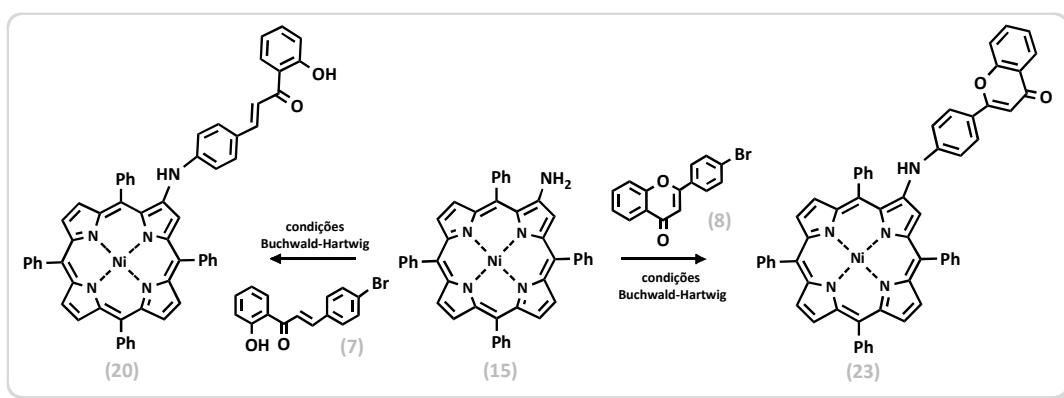
Neste ciclo catalítico, verifica-se que a formação da ligação carbono-nitrogénio entre as unidades flavonoide e porfirina é feita através da obtenção de um intermediário pentacoordenado (A), o qual é resultado da coordenação do haleto de arilo (flavonoide) com a amina (porfirina). Posteriormente, a adição de uma base forte permite que ocorra a desprotonação da amina obtendo-se o intermediário (B), que após sofrer uma eliminação redutiva origina o composto pretendido.

Como mencionado anteriormente, neste trabalho pretendeu-se sintetizar díades do tipo porfirina-flavonoide, procedendo-se para isso à síntese de quatro díades distintas. A síntese de duas das díades foi realizada pelo acoplamento do derivado **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** com os flavonoides **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** e **4'-BROMOFLAVONA (8)**, mediante a formação de uma ligação carbono-nitrogénio (C-N) entre o grupo amino do grupo fenilo da posição *meso* da porfirina e o átomo de carbono em posição *para* do anel B do flavonoide (**ESQUEMA 26**).



ESQUEMA 26. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO*.

A síntese das restantes duas díades resultou do acoplamento entre o outro derivado porfirínico sintetizado, a **Ni(II)-NH₂-TPP (15)**, com os flavonoides **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** e **4'-BROMOFLAVONA (8)**, através da formação de uma ligação C-N entre o grupo amino da posição β-pirrólica da porfirina e o átomo de carbono em posição *para* do anel B do flavonoide (**ESQUEMA 27**).



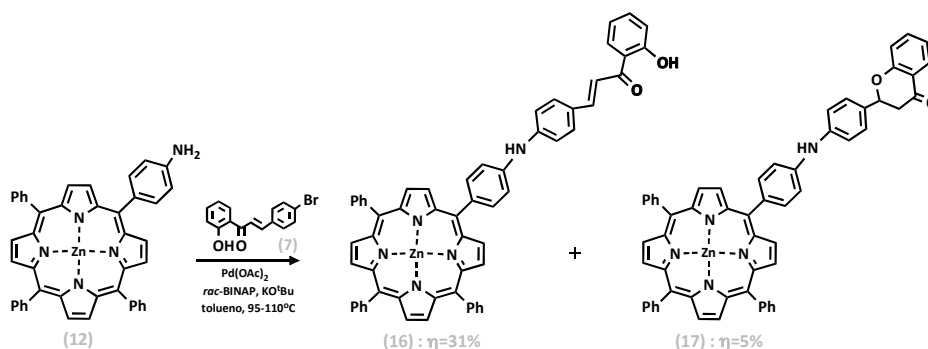
ESQUEMA 27. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β-PIRRÓLICA.

3.2.3.2. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO*

Inicialmente, procedeu-se à síntese das díades porfirina-flavonoide em posição *meso*, tendo-se obtido a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** e a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)**. As condições reacionais envolvidas na síntese destas duas díades, foram as condições padrão de uma reação de aminação de Buchwald-Hartwig, mais concretamente, foi utilizado como catalisador o acetato de paládio ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$), como ligando o *rac*-BINAP e como base o *terc*-butóxido de potássio (KO^tBu). Estas reações ocorreram em tolueno seco em fio de sódio e foram mantidas sob agitação magnética, a uma temperatura de 95-110 °C e numa atmosfera de nitrogénio.

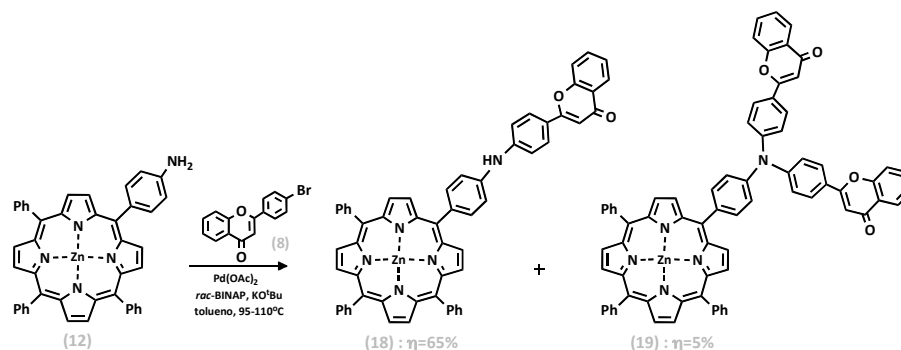
Ambas as reações de síntese das díades foram controladas por TLC, sendo que apesar de ainda haver material de partida por consumir estas foram dadas por terminadas, sendo a reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso* terminada ao fim de 30 h, ao passo que a reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso* foi mais rápida, tendo sido terminada ao fim de 23 h. O processo de finalização destas duas reações envolveu inicialmente a filtração da mistura reacional por uma pequena coluna de Celite®-545, sendo o material porfirínico removido com clorofórmio. Em seguida, foram realizados os procedimentos habituais de lavagem com água destilada, extração com clorofórmio e secagem sobre sulfato de sódio anidro. Após a remoção do solvente no evaporador rotativo, os resíduos obtidos foram retomados em clorofórmio, sendo purificados por cromatografia preparativa em camada fina.

Relativamente ao processo de purificação da reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, foi utilizado como eluente o clorofórmio, tendo-se conseguido isolar três compostos principais, os quais foram identificados, a partir do maior R_f , como sendo a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)**, a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** e a porfirina de partida **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** (ESQUEMA 28).



ESQUEMA 28. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16) EM POSIÇÃO MESO.

No processo de purificação da reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso*, foi possível numa primeira purificação utilizando como eluente o clorofórmio isolar o composto que apresentava maior R_f, o qual se tratava da **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** que ficou por consumir. Numa segunda purificação utilizando como eluente uma mistura de clorofórmio e acetato de etilo a 2,5%, foi possível isolar mais dois compostos principais, sendo os seus constituintes identificados, como a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** com o maior R_f e a **TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (19)** com o menor R_f (ESQUEMA 29).



ESQUEMA 29. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18) EM POSIÇÃO MESO.

Em Química Orgânica, a caracterização estrutural dos compostos sintetizados apresenta-se como um dos aspetos mais importantes uma vez que permite uma identificação inequívoca destes. Como tal, os compostos isolados neste trabalho foram caracterizados estruturalmente recorrendo-se a várias técnicas, nomeadamente à espectroscopia de UV-Vis, à espectroscopia de RMN monodimensional (RMN de ¹H e de ¹³C) e bidimensional (HMBC, HSQC) e à espectrometria de massa (MALDI, ESI e/ou HRMS-ESI).

A análise do espectro de UV-Vis da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso* em DMF, permitiu observar a existência de uma banda a um menor comprimento de onda referente à absorção da calcona (λ 314 nm) e três bandas a comprimentos de ondas maiores referentes à porfirina (banda Soret a λ 427 nm, banda Q II a λ 560 nm e banda Q I a λ 600 nm). Este espectro confirma não só a presença da calcona e do macrociclo tetrapirrólico mas que este último se encontra na forma complexada (**FIGURA 19**).

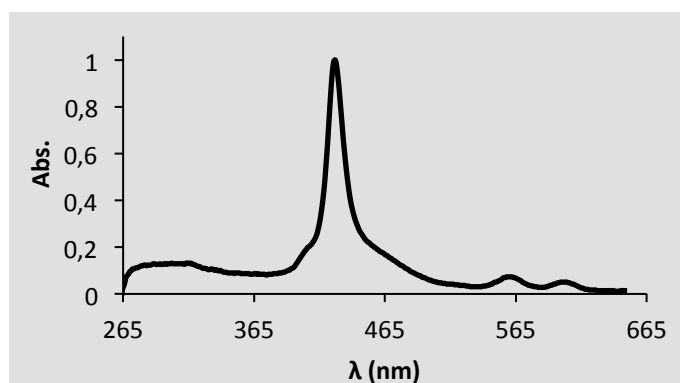


FIGURA 19. ESPETRO DE UV-VIS DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16) EM POSIÇÃO *MESO*.

Relativamente à análise por RMN da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, foi possível pela observação do espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 20**) verificar que a δ 6,39 ppm surge um singuleto largo correspondente à ressonância do próton do grupo amino (NH), o qual indica que o acoplamento entre as unidades flavonoide e porfirina ocorreu através do grupo amino da porfirina **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** como pretendido.

Os sinais gerados pela ressonância dos prótons H-5''' e H-3''', surgem a δ 6,93 e 6,99 ppm, em forma de duplo duplete de dupletos e de duplo duplete, respetivamente. Estes prótons do anel A da calcona são os que surgem a menores desvios químicos, uma vez que se encontram nas posições *para* e *meta* em relação ao grupo hidroxilo, que os protege devido ao seu efeito mesomérico (OH - grupo dador de eletrões).

A δ 7,32 e 7,68 ppm surgem dois sinais, ambos em forma de duplete referentes à ressonância dos prótons H-2'',6'' e H-3'',5''. Os prótons H-2'',6'' encontram-se a um desvio químico inferior, uma vez que se encontram nas posições *orto* em relação ao grupo amino que os protege pelo seu efeito mesomérico (NH - grupo dador de eletrões).

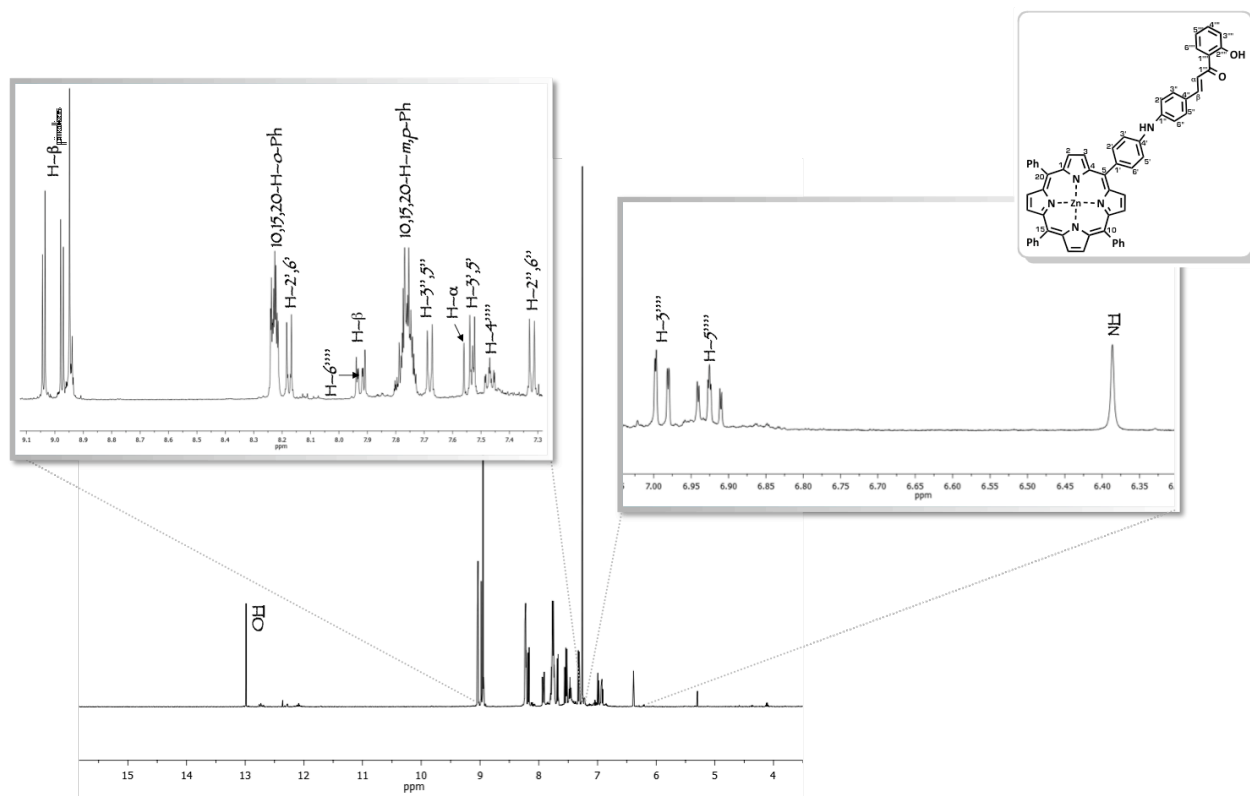


FIGURA 20. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16) EM POSIÇÃO MESO.

Os sinais gerados pela ressonância dos restantes protões do anel A da calcona ($\text{H}4'''$ e $\text{H}6'''$) surgem a δ 7,47 e 7,93 ppm, em forma de duplo duplete de dupletos e de duplo duplete. Estes protões encontram-se nas posições *para* e *orto* em relação ao grupo carbonilo, sendo portanto desprotegidos devido ao efeito mesomérico deste substituinte ($\text{C}=\text{O}$ - grupo sacador de eletrões).

A δ 7,53 e 8,18 ppm, surgem dois sinais em forma de duplete devido à ressonância dos protões $\text{H}-3',5'$ e $\text{H}-2',6'$, sendo os protões $\text{H}-3',5'$ os que se encontram a um desvio químico menor devido ao efeito mesomérico do grupo amino, que os protege pelo facto de se encontrarem nas posições *orto* em relação a este.

Quanto aos sinais gerados pela ressonância dos protões $\text{H}-\alpha$ e $\text{H}-\beta$, estes surgem a δ 7,54 e 7,92 ppm, ambos em forma de duplete. O protão $\text{H}-\beta$ trata-se do protão mais desprotegido devido ao efeito anisotrópico do grupo carbonilo. A constante de acoplamento entre estes dois protões é $J = 15,3$ Hz, o que indica que dupla ligação da calcona manteve a estereoquímica inicial *E*.

A δ 7,73-7,79 ppm surge um sinal em forma de multiplete, gerado pela ressonância de nove prótons, sendo este atribuído aos seis prótons das posições *meta* e aos três prótons das posições *para* dos grupos fenilo das posições 10, 15 e 20 da porfirina. Quanto ao sinal gerado pela ressonância dos prótons das posições *orto* dos grupos fenilo das posições 10, 15 e 20 da porfirina, este surge também em forma de multiplete, a δ 8,21-8,24 ppm. Os prótons *orto*, relativamente aos prótons *meta* e *para*, são aqueles que se apresentam espacialmente mais próximos do macrociclo porfirínico, estando portanto mais desprotegidos e surgindo os sinais gerados pela sua ressonância a maiores desvios químicos.

Uma vez que esta porfirina apresenta plano de simetria, o sinal referente à ressonância de quatro dos prótons H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$ surge a δ 8,95 ppm em forma de singuleto, enquanto que a ressonância dos restantes quatro prótons H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$ surge como um sistema AB a δ 8,97 e 9,03 ppm com uma constante de acoplamento $J = 4,6$ Hz.

Com o maior desvio químico, a δ 12,99 ppm, surge ainda o sinal referente à ressonância do próton do grupo hidroxilo da calcona em forma de singuleto largo.

Relativamente à análise do espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 21), foi possível identificar inequivocamente os carbonos da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*. Esta análise foi auxiliada pelos espectros de HSQC obtidos, os quais permitiram a identificação dos carbonos ligados diretamente a prótons.

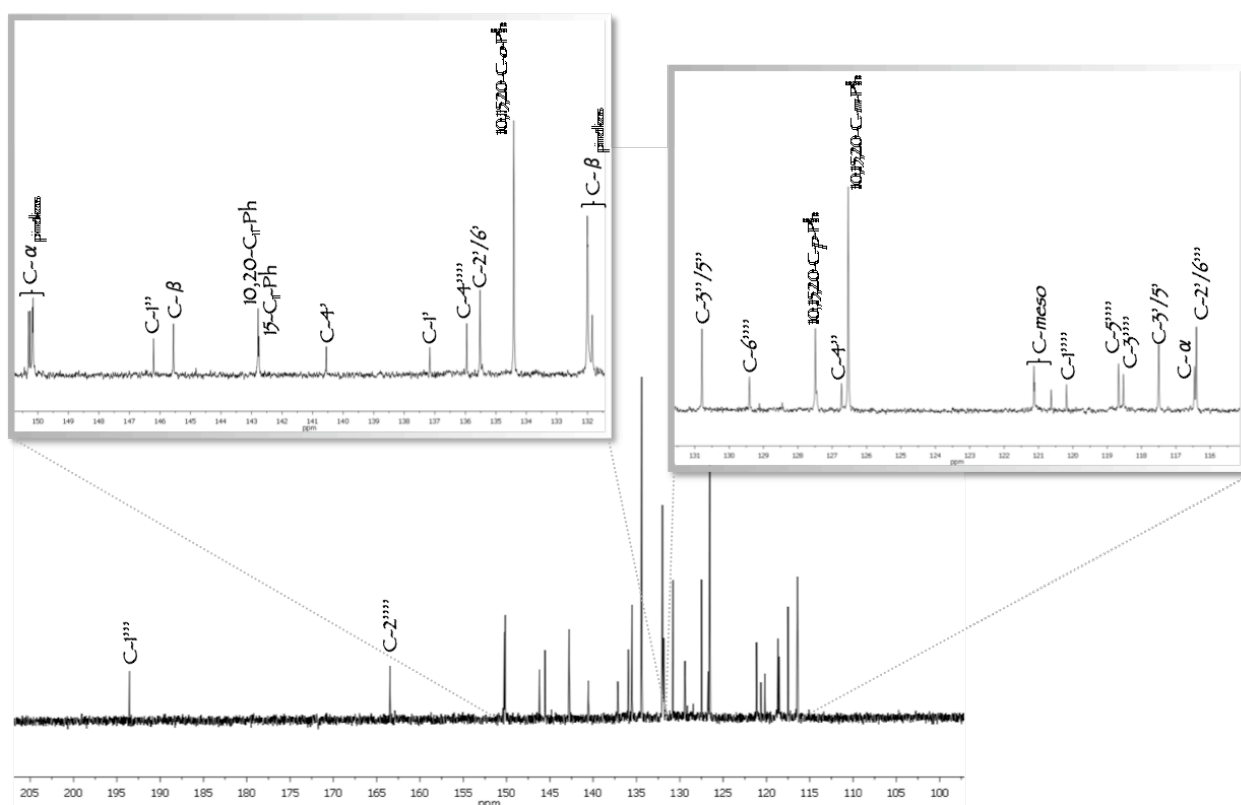


FIGURA 21. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16) EM POSIÇÃO MESO.

A identificação dos carbonos quaternários presentes na estrutura desta díade foi conseguida através da análise do espectro de HMBC (FIGURA 22). Relativamente, aos sinais dos carbonos quaternários do grupo fenilo da posição 5 da porfirina (C-1' e C-4'), estes surgem a δ 137,2 e 140,6 ppm, respetivamente. De entre estes, o sinal do carbono C-4' surge um pouco mais desprotegido devido ao facto de este se encontrar ligado ao átomo de nitrogénio do grupo amino que o desprotege por indução.

A δ 146,6 e 126,7 ppm surgem os sinais referentes aos carbonos C-1'' e C-4'' do anel B da calcona. Igualmente para este caso, o C-1'' é o mais desprotegido uma vez que se encontra ligado ao átomo de nitrogénio do grupo amino que o desprotege devido ao seu efeito indutivo.

Do anel A da calcona surgem dois sinais, um a δ 120,2 ppm e o outro a δ 163,5 ppm, os quais correspondem aos carbonos C-1''' e C-2''', respectivamente. O carbono C-2''' apresenta-se como o mais desprotegido mediante o facto de se encontrar ligado ao átomo de oxigénio do grupo hidroxilo que o desprotege por indução, bem como por se

encontrar em posição *orto* em relação ao grupo carbonilo que o desprotege devido ao seu efeito mesomérico.

A desvios caraterísticos do grupo carbonilo surge um sinal a δ 193,6 ppm referente ao carbono C-1''''.

Para além da identificação dos carbonos quaternários, a análise por HMBC permitiu principalmente confirmar a ocorrência do acoplamento entre as unidades flavonoide e porfirina, uma vez que o protão do grupo amino apresenta correlações quer com os carbonos C-3' e C-5' da porfirina quer com os carbonos C-2'',6'' da calcona (**FIGURA 22**).

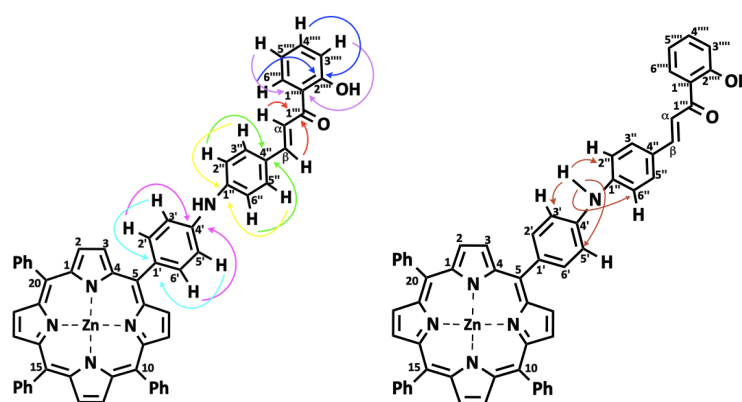


FIGURA 22. CONECTIVIDADES MAIS RELEVANTES OBSERVADAS NO ESPECTRO DE HMBC DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (**16**) EM POSIÇÃO *MESO*.

A análise do espectro de massa em HRMS - ESI apresenta um ião molecular com razão m/z de 913,2 correspondente ao ião molecular $[M^+]$. Perante os resultados espectroscópicos obtidos para este composto podemos afirmar inequivocamente que estamos perante a díade do tipo porfirina-calcon pretendida.

Um segundo composto isolado do processo de purificação da reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso* foi isolado e caracterizado como sendo a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** em posição *meso*. A obtenção desta segunda díade foi resultado do acoplamento da **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** com a 4'-bromoflavanona, a qual não foi isolada mas que certamente se encontrava no meio reacional, uma vez que este composto se encontra em equilíbrio com a respectiva **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)**. Assim sendo, a existência deste equilíbrio torna esta reação competitiva, podendo a

porfirina reagir com os dois flavonoides presentes no meio reacional. Contudo, perante os rendimentos obtidos para a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** leva a concluir que a quantidade de 4'-bromoflavanona presente no meio é bastante reduzida.

Pela análise do espectro de UV-Vis da **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** em posição *meso* em DMF, é possível verificar que esta apresenta um espectro análogo ao da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, observando-se uma banda a comprimentos de onda na região do UV referente à flavanona (λ 310 nm) e três bandas a comprimentos de onda na região do visível referentes à porfirina (banda Soret a λ 427 nm, banda QII a λ 560 nm e banda QI a λ 603 nm). Perante este tipo de espectro com apenas duas bandas Q para a porfirina, confirma-se novamente a presença do macrociclo porfirínico na sua forma complexada (**FIGURA 23**).

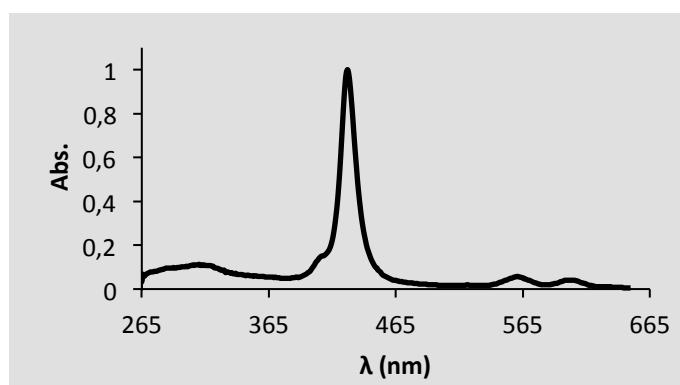


FIGURA 23. ESPETRO DE UV-VIS DA DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17) EM POSIÇÃO *MESO* .

A análise por RMN da **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** em posição *meso*, permitiu pela observação do espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 24**) verificar que este se apresenta bastante semelhante ao espectro obtido para a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, apresentando igualmente os sinais gerados pela ressonância dos prótons da porfirina mas surgindo diferenças nos sinais que dizem respeito à identificação do flavonoide.

Para este composto, verifica-se igualmente a existência de um sinal a δ 6,20 ppm em forma de singuleto largo gerado pela ressonância do próton do grupo amino, o que é indicativo de que o acoplamento entre as unidades flavonoide e porfirina ocorreu novamente através do grupo amino da porfirina **Zn(II)-NH₂-TPP (15)**.

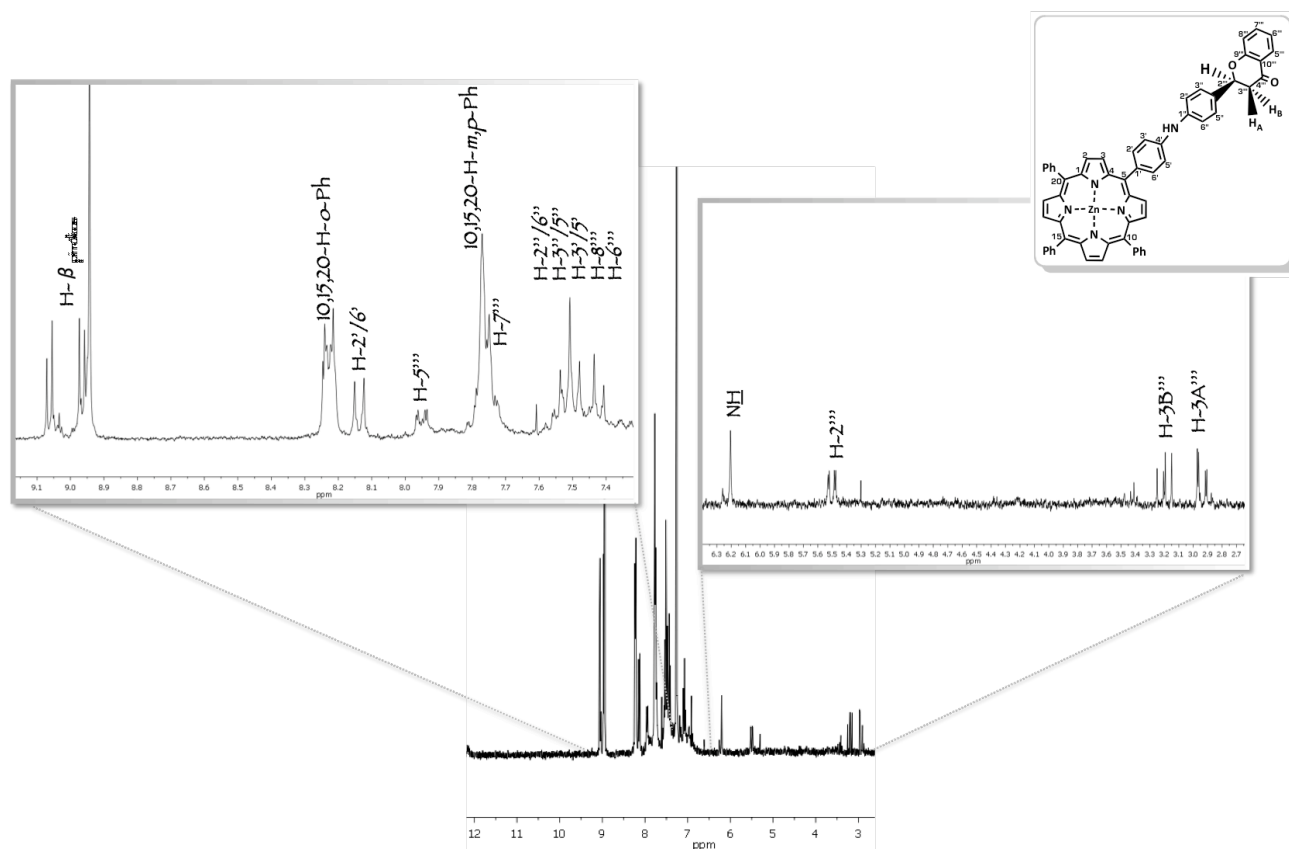


FIGURA 24. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17) EM POSIÇÃO MESO.

Comparando com o espectro da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, é possível observar neste espectro a inexistência do sinal referente à ressonância do próton do grupo hidroxila do anel A da calcona assim como os sinais gerados pela ressonância dos prótons H- α e H- β da dupla ligação da calcona, e como tal foi possível concluir que o composto acoplado à porfirimina não se tratava de uma calcona. Por outro lado, o surgimento de três novos sinais a desvios químicos baixos, permitiu concluir que se tratava dos sinais referentes à ressonância dos prótons H-2''', H-3A''' e H-3B''', os quais são característicos de uma flavanona.

Os sinais gerados pela ressonância dos prótons H-3A''' e H-3B''' surgem a δ 2,94 e 3,20 ppm, ambos em forma de duplo duplete ($J = 16,9$ Hz). A δ 5,50 ppm surge o sinal referente à ressonância do próton H-2''', também em forma de duplo duplete, com uma constante $J = 2,8$ Hz resultante do acoplamento com o próton H-3A''' indicando o acoplamento destes prótons em *trans* e uma constante $J = 13,2$ Hz resultante do acoplamento com o próton H-3B''' indicando o acoplamento destes prótons em *cis*.

Para os prótons do anel A da flavanona, verifica-se que os sinais referentes à ressonância dos prótons H-6''' e H-8''' surgem entre δ 7,48-7,54 ppm em forma de multipletto, sendo estes os prótons mais protegidos deste anel uma vez que se encontram nas posições *para* e *orto* em relação ao átomo de oxigênio do anel heterocíclico C que os protege devido ao seu efeito mesomérico. Os sinais gerados pela ressonância dos restantes prótons do anel A surgem a desvios químicos superiores, sendo que o sinal do próton H-5''' surge a δ 7,95 ppm em forma de duplo dupletto e o sinal do próton H-7''' surge entre δ 7,71-7,80 ppm em forma de multipletto.

Pela análise de massa em MALDI verifica-se a presença de um ião molecular com m/z 913,2 correspondente ao $[M^+]$. Esta análise complementa a identificação da díade, apesar de esta apresentar um ião molecular com a mesma razão m/z que a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, sendo que a realização de apenas esta análise não seria por si só conclusiva para a identificação do composto em questão. Contudo, as várias análises realizadas em conjunto permitem afirmar que o composto isolado se trata da díade do tipo porfirina-flavanona identificada.

Relativamente à díade do tipo porfirina-flavona, foram também realizados vários estudos de caracterização, tendo-se verificado que a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso*, apresenta como seria de esperar um espectro de UV-Vis em DMF bastante semelhante ao das díades referidas anteriormente. Para esta díade observa-se igualmente um espectro com quatro bandas, uma banda referente à flavona (λ 302 nm) e as restantes três bandas referentes à porfirina (banda Soret a λ 428 nm, banda QII a λ 560 nm e banda QI a λ 600 nm) (**FIGURA 25**). Perante este espectro de UV-Vis confirma-se igualmente neste caso a presença do macrociclo porfirínico na sua forma complexa.

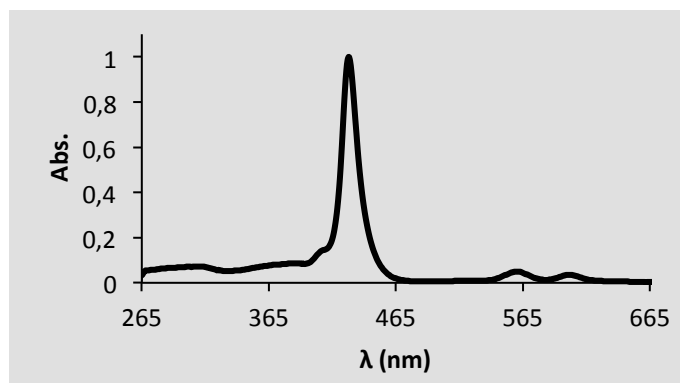


FIGURA 25. ESPETRO DE UV-VIS DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18) EM POSIÇÃO MESO.

No que diz respeito à análise por RMN da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso*, pela observação do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 26) verifica-se que este se apresenta análogo aos espectros referidos anteriormente, sendo este ainda mais semelhante ao espectro da **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** em posição *meso*, uma vez que ambos os compostos se encontram na forma ciclizada comparativamente à calcona.

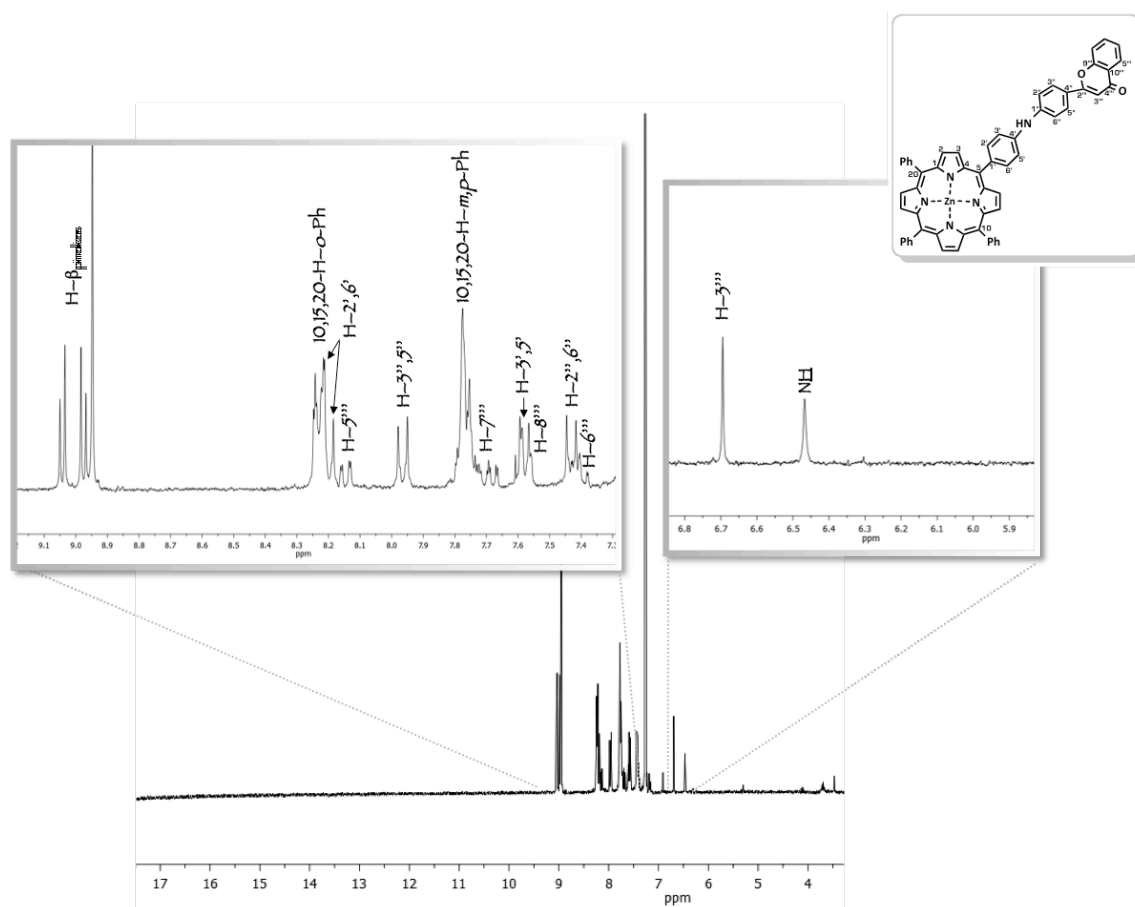


FIGURA 26. ESPETRO DE RMN DE ^1H DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18) EM POSIÇÃO MESO.

Neste espectro, verifica-se também um sinal a δ 6,47 ppm o qual é referente à ressonância do próton do grupo amino, pelo que se demonstra mais uma vez que o acoplamento entre o flavonoide e a porfirina ocorreu através deste grupo.

Comparando este espectro com o da **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** em posição *meso*, verifica-se a inexistência dos três sinais característicos de uma flavanona, ou seja, os sinais gerados pela ressonância do próton H-2''' e dos prótons H-3'''(A e B) do anel C, sendo neste caso apenas observado um próton para este mesmo anel, o que é indicativo de que este se encontra oxidado. Assim, o sinal gerado pela ressonância do próton H-3''' do anel C da flavona verifica-se que surge a δ 6,70 ppm sob a forma de um singuleto.

Perante os resultados espectroscópicos obtidos considerou-se que este composto isolado se tratava realmente da díade porfirina-flavona pretendida. O espectro de massa em MALDI, veio reconfirmar esta ideia, pelo que este apresenta um ião molecular com uma razão m/z 911,2 o qual é correspondente ao ião $[M^+]$.

Da reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso* foi também obtido um produto secundário, sendo este identificado como se tratando da **TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (19)** em posição *meso* e a qual resultou do acoplamento da **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** com duas unidades de **4'-BROMOFLAVONA (8)**.

Pela análise do espectro de UV-Vis da **TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (19)** em DMF, é possível observar um espectro igual ao da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso*, apresentando esta um espectro com quatro bandas, uma delas referente à banda da flavona (λ 306 nm) e três bandas referentes à porfirina (banda Soret a λ 427 nm, banda QII a λ 560 nm e banda QI a λ 600 nm) (**FIGURA 27**). Tal como para as díades anteriormente referidas, a presença de três bandas referentes à porfirina confirma que esta se encontra na sua forma complexada.

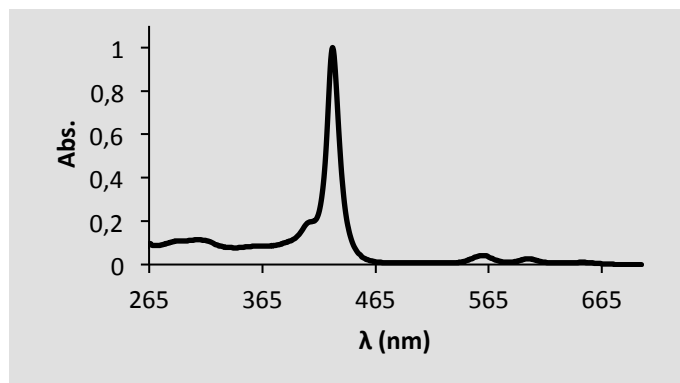


FIGURA 27. ESPETRO DE UV-VIS DA TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (19) EM POSIÇÃO MESO.

A análise por RMN da **TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (19)** em posição *meso*, permitiu observar pelo espectro de RMN ^1H (FIGURA 28) que este é bastante semelhante ao espectro da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso*, observando-se os mesmos sinais referentes à porfirina e os mesmo sinais referentes à flavona mas surgindo estes últimos com o dobro da integração.

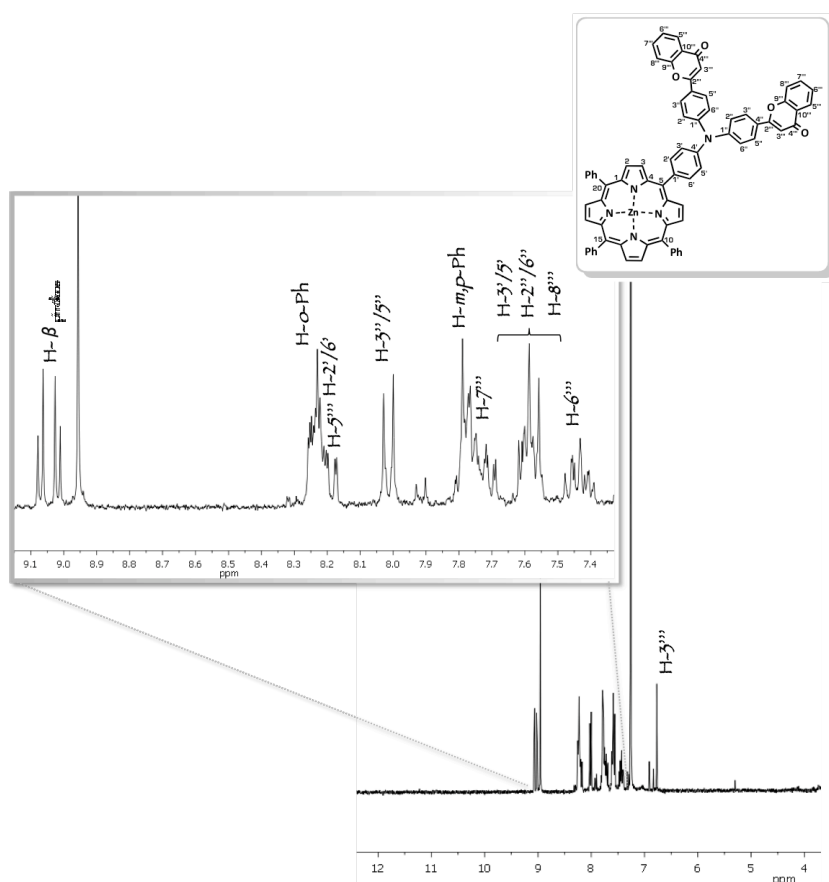


FIGURA 28. ESPETRO DE RMN DE ^1H DA TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (19) EM POSIÇÃO MESO.

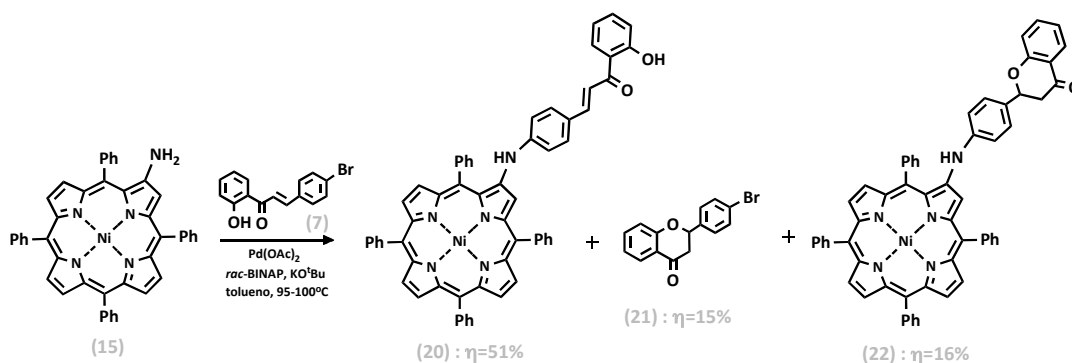
Comparativamente ao espectro da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso*, verifica-se a inexistência do sinal gerado pela ressonância do próton do grupo amino, o que demonstra que o grupo amino da porfirina foi neste caso disubstituído, podendo-se afirmar o acoplamento da porfirina com duas unidades de flavona.

A caracterização estrutural também por massa em MALDI, veio confirmar que o composto foi devidamente identificado como uma tríade, apresentando um espectro com um íão molecular com razão m/z 1131,2 correspondente ao íão $[M^+]$.

3.1.3.3. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA

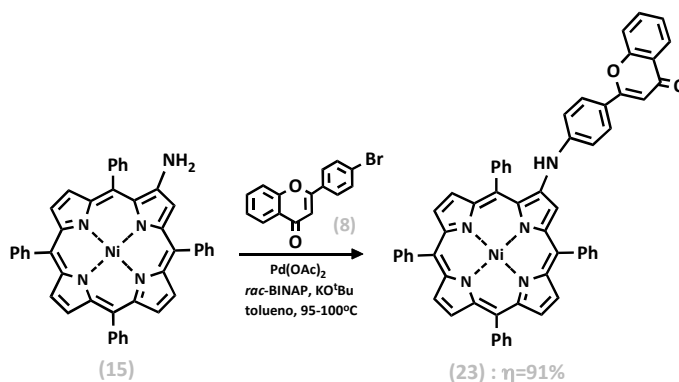
Uma vez obtidas as díades porfirina-flavonoide em posição *meso*, procedeu-se à síntese das díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica, tendo-se conseguido obter a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** e a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)**. As reações de síntese destas duas díades foram realizadas utilizando as mesmas condições reacionais da síntese das díades porfirina-flavonoide em posição *meso*. O seu término seguiu o procedimento padrão utilizado anteriormente, sendo que a reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** foi dada por terminada ao fim de 8h, ao passo que a reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** foi mais demorada, tendo sido terminada ao fim de 65 h.

O processo de purificação destas díades foi igualmente realizado como para as díades porfirina-flavonoide em posição *meso* através da utilização de cromatografia preparativa em camada fina. Relativamente ao processo de purificação da reação de síntese da segunda díade porfirina-calcona, a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** em posição β -pirrólica, foi utilizado como solvente uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:1), o que permitiu isolar três compostos maioritários, sendo a fração de maior R_f constituída pela **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** em posição β -pirrólica pretendida, a fração intermédia constituída pela **4'-BROMOFLAVANONA (21)** e a fração de menor R_f constituída pela nova **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22)** em posição β -pirrólica (**ESQUEMA 30**).



ESQUEMA 30. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Para proceder à purificação da reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** em posição β -pirrólica, utilizou-se numa primeira purificação como eluente o clorofórmio, tendo-se conseguido isolar o composto com o maior R_f sendo este identificado como a **Ni(II)-NH₂-TPP (12)** que ficou por reagir. Numa segunda purificação utilizando uma mistura de clorofórmio e acetato de etilo a 2,5%, foi isolado apenas um composto principal, tratando-se esta da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** pretendida (**ESQUEMA 31**).



ESQUEMA 31. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Em relação à análise do espectro de UV-Vis da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** em posição β -pirrólica em DMF, podemos verificar que este apresenta igualmente como a díade **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, um espectro com quatro bandas, uma a um comprimento de onda na região do UV referente à calcona (λ 277 nm) e as restantes três a comprimentos de onda mais elevados na região do visível referentes à porfirimina (banda Soret a λ 414 nm, banda QII a λ 538 nm e banda QI a λ 585 nm) (**FIGURA 29**). Assim perante este espectro, confirma-se novamente a presença do macrociclo porfirínico na sua forma complexada.

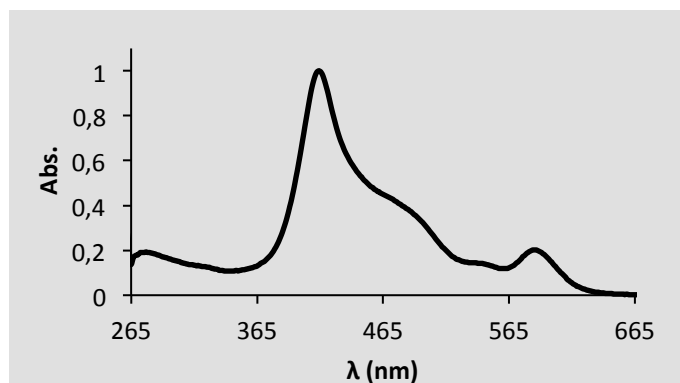


FIGURA 29. ESPETRO DE UV-VIS DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

A análise por RMN da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** em posição β -pirrólica, permitiu observar pelo seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 30) que a δ 6,55 ppm surge o sinal referente à ressonância do próton do grupo amino da porfirina, pelo que se verifica que o acoplamento entre as unidades ocorreu igualmente como para as díades em posição *meso* através do grupo amino da porfirina.

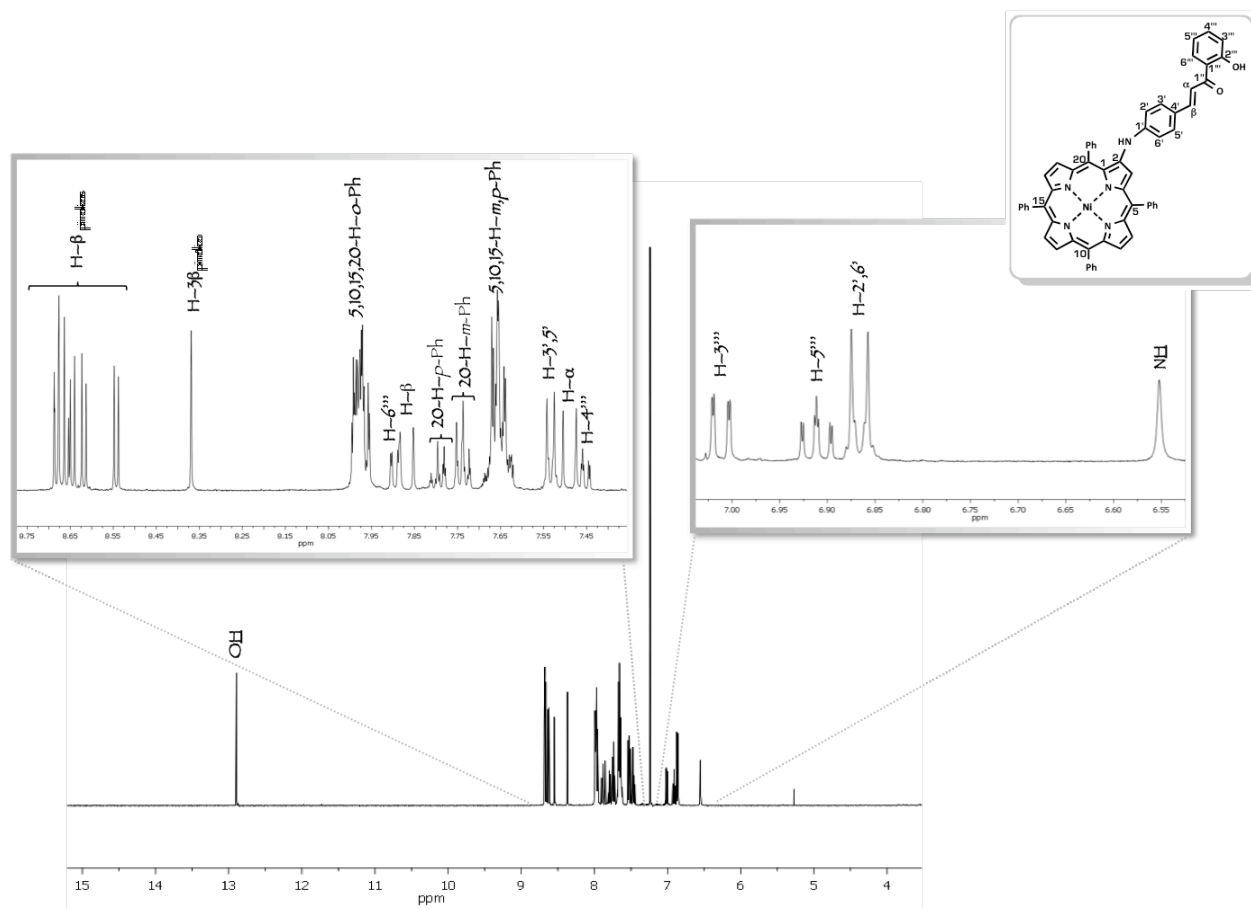


FIGURA 30. ESPETRO DE RMN DE ^1H DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Comparando o espectro desta díade com o espectro da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, podemos considerar que estes são similares verificando-se apenas diferenças em alguns sinais referentes à porfirina. Uma dessas diferenças consiste no desaparecimento dos dupletos referente à ressonância dos prótons H-2'',3'' e H-3'',5'', sendo que neste caso, o sinal referente à ressonância dos prótons das posições *para* e *meta* dos grupos fenilo das posições 5, 10 e 15 da porfirina surge entre δ 7,64-7,67 ppm em forma de multipletto. Os sinais referentes à ressonância dos prótons da posição *para* e *meta* do grupo fenilo da posição 20 da porfirina surgem entre δ 7,78-7,81 e 7,72-7,75 ppm, ambos em forma de multipletto. Posto isto, podemos verificar que o facto de a porfirina apresentar a calcona como substituinte na posição β -pirrólica promove a desproteção dos prótons do grupo fenilo da posição 20 da porfirina encontrando-se estes a desvios químicos um pouco mais elevados. Os prótons das posições *orto* dos quatro grupos fenilo da porfirina, entraram em ressonância a δ 7,95-7,99 ppm gerando um sinal em forma de multipletto.

Para esta díade, verifica-se que a δ 6,87 e 7,53 ppm surgem dois sinais referentes à ressonância dos prótons H-2',6' e H-3',5' em forma de dupletto, os quais se encontram a desvios químicos inferiores em relação ao espectro da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*. Tal pode ser justificado pela proximidade destes prótons ao grupo fenilo da posição 20 da porfirina que os protege devido ao seu efeito anisotrópico.

Os sinais referentes à ressonância dos prótons H- α e H- β , surgem a δ 7,49 e 7,87 ppm, em forma de dupletto, com uma constante de acoplamento $J = 15,4$ Hz, o que indica novamente que a dupla ligação da calcona apresenta estereoquímica *E*.

A δ 8,37 ppm surge um sinal em forma de singuleto gerado pela ressonância do próton H-3 β _{pirrólico}. Os restantes seis prótons H- β _{pirrólicos} como podemos verificar surgem como três sistemas AB, um a δ 8,54 e 8,64 ppm ($J = 4,9$ Hz), outro a δ 8,61 e 8,6808 ppm ($J = 5,0$ Hz) e outro a δ 8,66 e 8,6812 ppm ($J = 5,0$ Hz).

Relativamente à análise do espectro de RMN de ^{13}C (**FIGURA 31**), foi possível efetuar a identificação correta dos carbonos da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (18)** em posição β -pirrólica, sendo que a análise apoiada nos espectros de HSQC permitiu a identificação dos carbonos ligados diretamente a prótons.

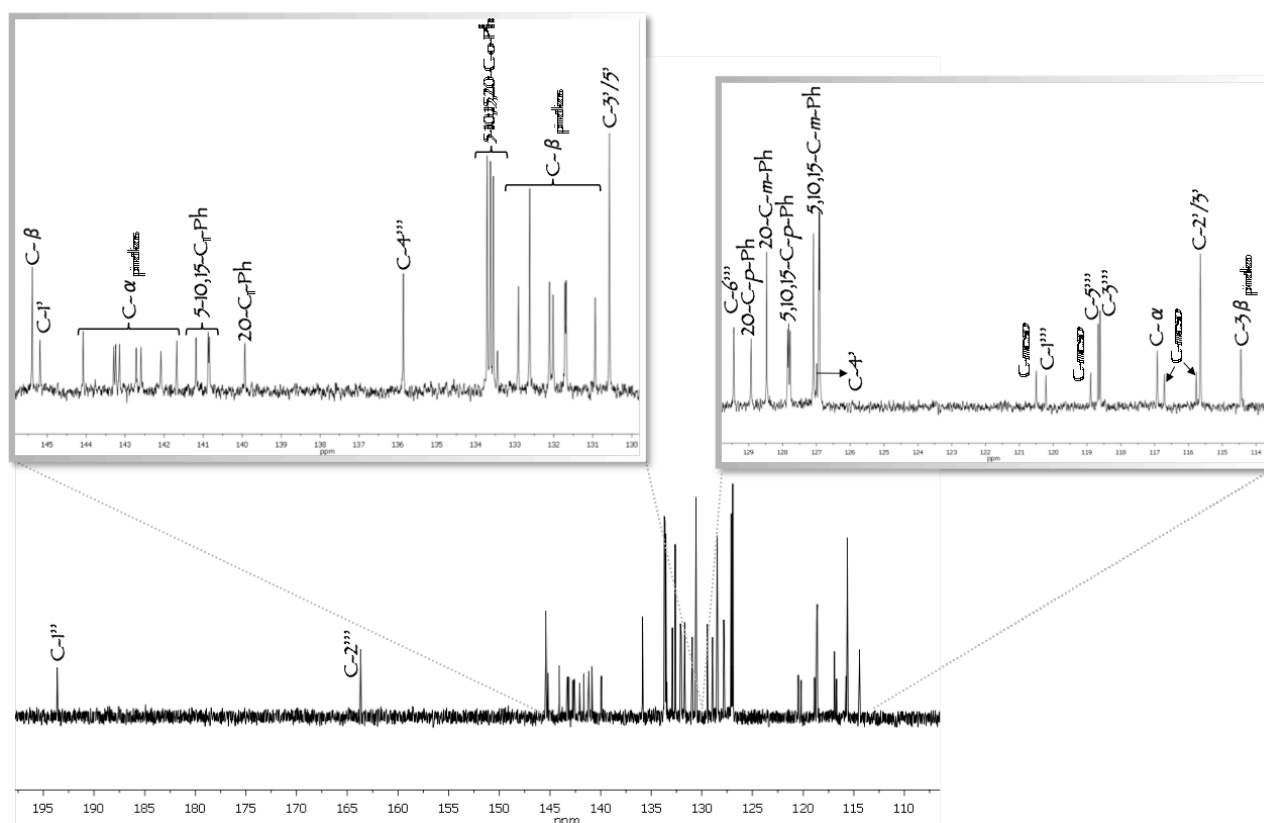


FIGURA 31. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Pela análise dos espectros de HMBC foi possível a identificação dos carbonos quaternários presentes na estrutura desta díade (**FIGURA 32**). Os sinais gerados pelos carbonos quaternários do anel B da calcona (C-1' e C-4'), surgem a δ 145,2 e 127,0 ppm, respetivamente. O carbono C-1' trata-se do carbono mais desprotegido, uma vez que este se encontra ligado ao átomo de nitrogénio do grupo amino que o desprotege indutivamente.

Para os carbonos quaternários do anel A da calcona, C-1''' e C-2''', verifica-se que os seus sinais surgem a δ 120,2 e 163,7 ppm. Podemos observar que o carbono C-2''' se apresenta como sendo o mais desprotegido mediante o facto de este se encontrar ligado ao átomo de oxigénio do grupo hidroxilo que o desprotege por indução, bem como se encontrar em posição *orto* em relação ao grupo carbonilo que o desprotege devido ao seu efeito mesomérico.

A desvios característicos do grupo carbonilo surge um sinal a δ 193,7 ppm referente ao carbono C-1".

Tal como para a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)**, a análise do espectro de HMBC desta díade permitiu principalmente visualizar as correlações existentes entre o próton do grupo amino com o flavonoide e porfirina. Assim, demonstra-se que realmente o acoplamento entre as unidades ocorreu como o pretendido pelo grupo amino da porfirina (**FIGURA 32**).

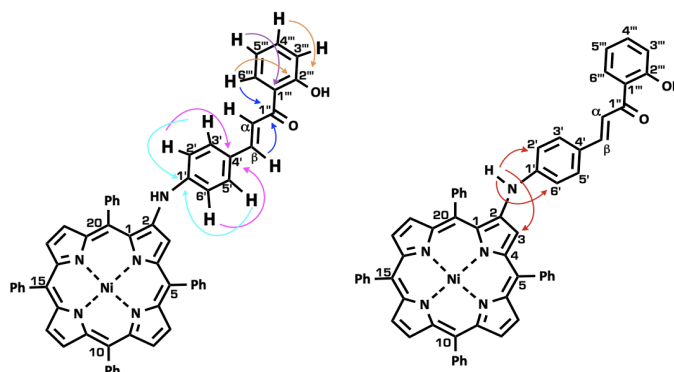


FIGURA 32. CONECTIVIDADES MAIS RELEVANTES OBSERVADAS NO ESPECTRO DE HMBC DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

A análise do espectro de HRMS - ESI confirma a estrutura pretendida, pelo que esta apresenta um ião molecular com razão m/z de 907,2 correspondente ao ião $[M^+]$.

Como referido, um outro composto foi isolado no processo de purificação da reação de síntese da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** em posição β -pirrólica, o qual foi identificado como sendo a **4'-BROMOFLAVANONA (21)**. Este composto não poderá ser considerado como um produto desta reação, uma vez que este se trata de uma estrutura que se encontra em equilíbrio com a **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** de partida. Contudo, a formação deste composto tornou novamente a reação competitiva, podendo a porfirina acoplar quer com a **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** quer com a **4'-BROMOFLAVANONA (21)**, e realmente, o acoplamento entre a porfirina ocorreu com os dois flavonoides, pelo que se verificou novamente a formação de uma **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22)**.

A análise do espectro de UV-Vis da **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22)** em posição β -pirrólica em DMF, permitiu identificar tal como para a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** quatro bandas, mas neste caso uma banda referente à flavanona (λ 275 nm) e três bandas referentes à porfirina (banda Soret a λ 415 nm, banda QII a λ 539 nm e banda QI a λ 582 nm) (**FIGURA 33**).

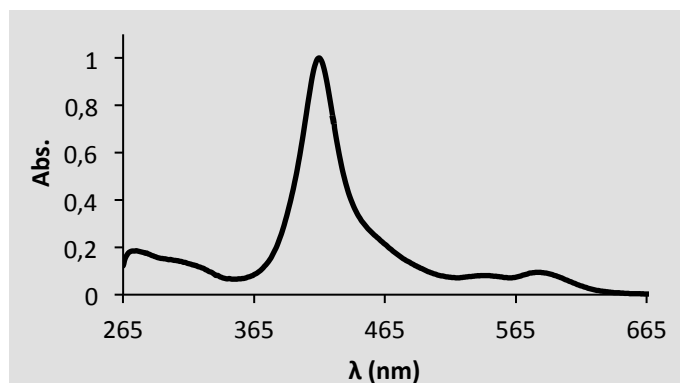


FIGURA 33. ESPETRO DE UV-VIS DA DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Pela análise por RMN, verifica-se que o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 34) da DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22) em posição β -pirrólica é semelhante ao da DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) em posição *meso*, verificando-se apenas diferenças no que diz respeito à identificação dos sinais referentes à flavanona.

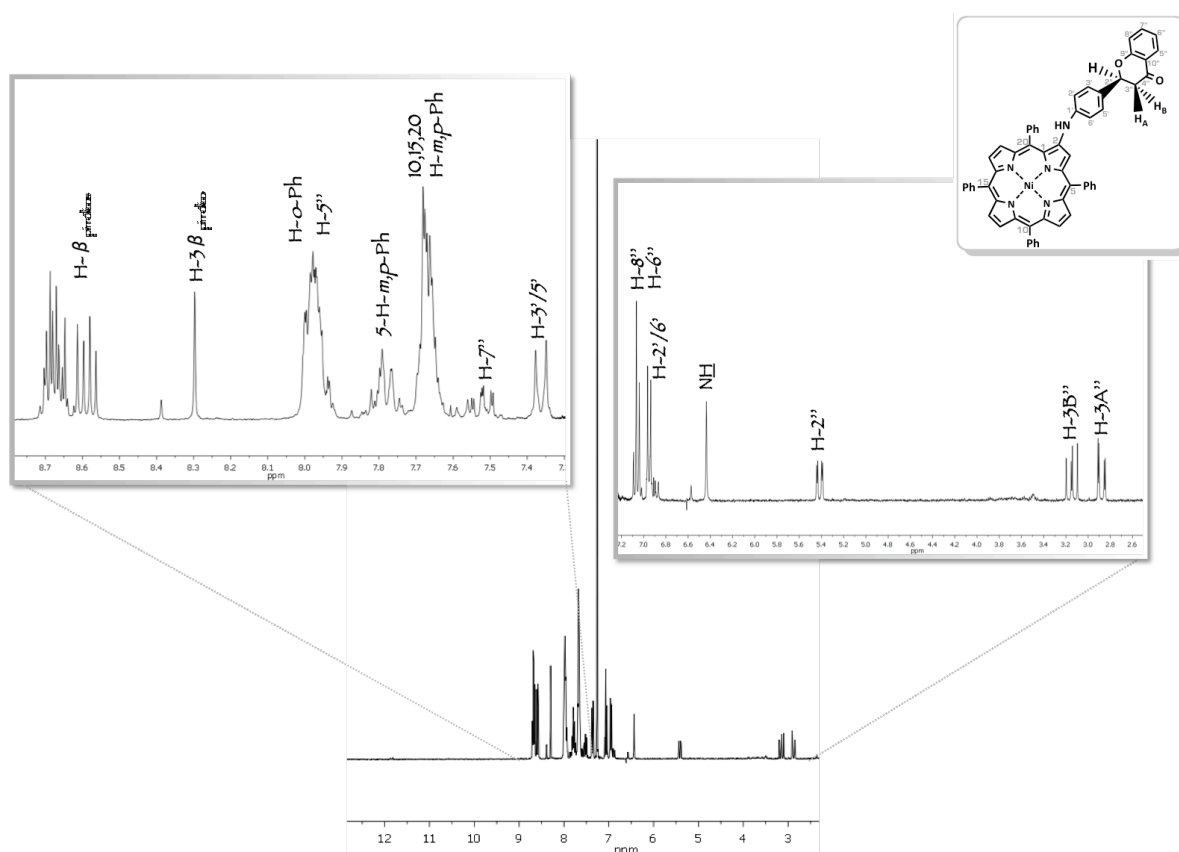


FIGURA 34. ESPETRO DE RMN DE ^1H DA DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Neste espectro foi identificado um sinal a δ 6,44 ppm em forma de singuleto largo, referente à ressonância do próton do grupo amino da porfirina confirmando-se novamente a ocorrência do acoplamento entre a unidade porfirina e flavonoide através deste grupo. Novamente, verifica-se que o flavonoide acoplado à porfirina não se trata de uma calcona mas sim de uma flavanona. Tal pode ser explicado através do desaparecimento dos sinais em forma de duplete referentes à ressonância dos prótons H- α e H- β , bem como o sinal em forma de singuleto largo referente à ressonância do próton do grupo hidroxilo. A identificação de que se trata de uma flavanona deve-se ao surgimento dos sinais referentes à ressonância dos prótons H-2'', H-3A'' e H-3B'', os quais são característicos de compostos do tipo flavanona. Assim, sinal referente à ressonância dos prótons H-3A'' e H-3B'' surgem a δ 2,88 e 3,15 ppm, ambos em forma de duplo duplete ($J = 16,9$ Hz). A δ 5,42 ppm surge o sinal referente à ressonância do próton H-2'', também em forma de duplo duplete, com $J = 2,8$ Hz resultante do acoplamento com o próton H-3A'' indicando um acoplamento em *trans* e $J = 13,4$ Hz resultante do acoplamento com o próton H-3B'' indicando o acoplamento em *cis*.

A análise de massa em MALDI permitiu confirmar de que se tratava da estrutura identificada, apresentando este espectro um íon molecular com maior razão m/z 913,2 correspondendo ao íon molecular $[M^+]$.

Quanto à **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (24)** em posição β -pirrólica esta apresenta um espectro de UV-Vis em DMF com quatro bandas, sendo uma delas referente à flavona (λ 300 nm) e as restantes três bandas referentes à porfirina (banda Soret a λ 417 nm, banda QII a λ 541 nm e a banda QI a λ 580 nm) (FIGURA 35).

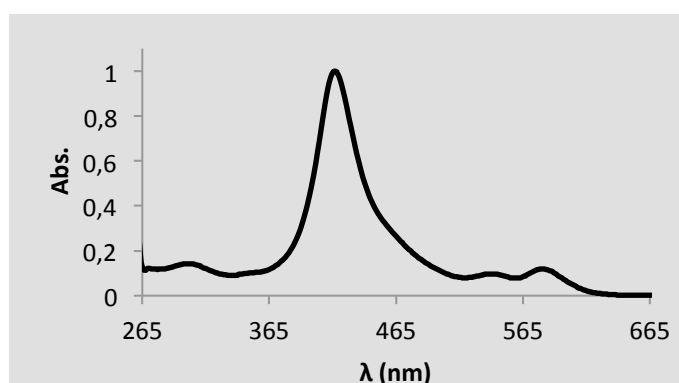


FIGURA 35. ESPETRO DE UV-VIS DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Pela análise em RMN, podemos verificar que o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 36) da DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) em posição β -pirrólica, é praticamente idêntico ao espectro da DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22). Para esta díade, observa-se também um sinal a δ 6,57 ppm em forma de singuleto largo referente à ressonância do próton do grupo amino, pelo que se verifica novamente a ocorrência do acoplamento entre as unidades flavonoide e porfirina através do grupo amino da porfirina.

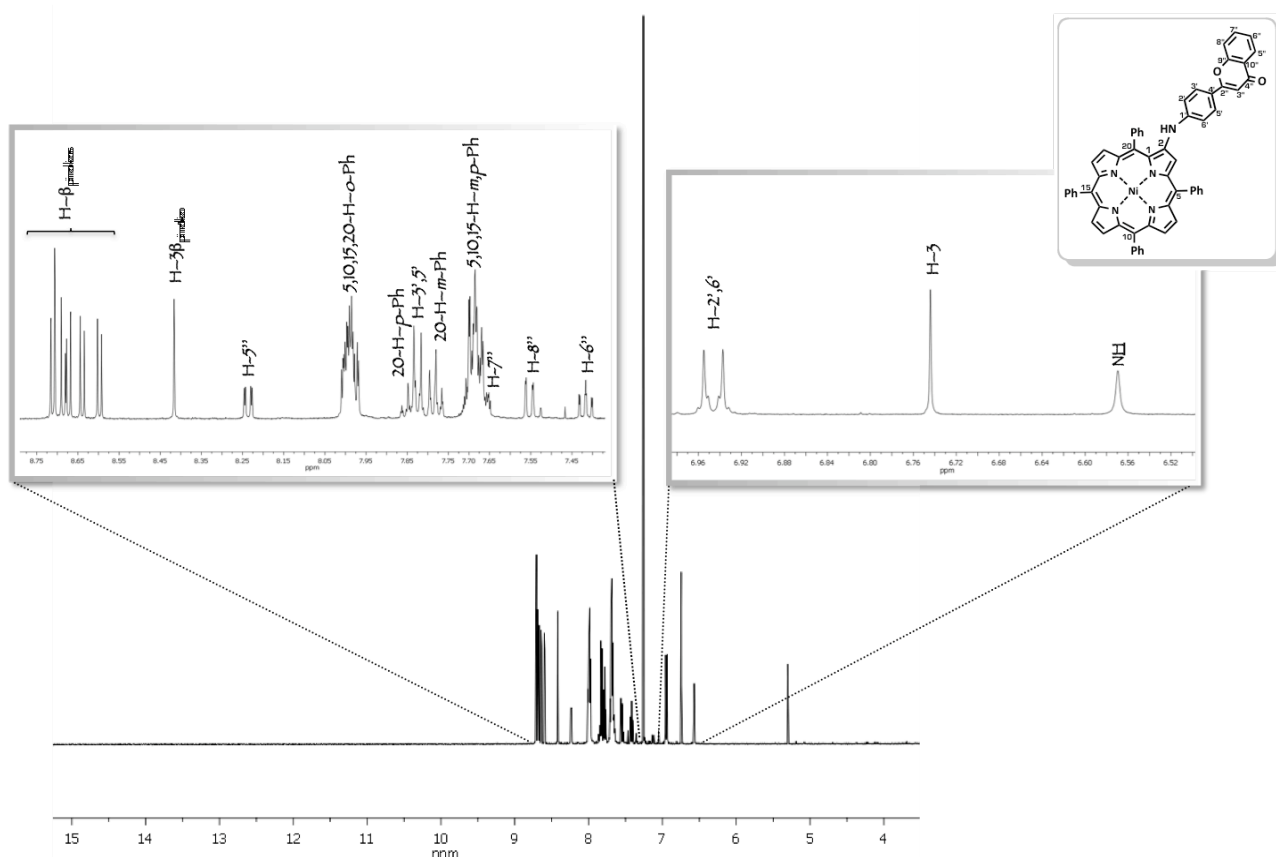


FIGURA 36. ESPETRO DE RMN DE ^1H DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Comparando com o espectro da DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22) em posição *meso*, é possível observar a inexistência dos três sinais que surgem a desvios químicos baixos referentes aos prótons H-2'' e H-3''(A e B). Neste caso, é visível apenas um sinal a δ 6,74 ppm em forma de singuleto, o qual é referente à ressonância de um próton H-3'' o que é indicativo de que o anel C da flavona se encontra oxidado.

Igualmente como para as díades anteriores em posição β -pirrólica, verifica-se que os sinais referentes à ressonância dos prótons H-2',6' e H-3',5' surgem a desvios inferiores (δ 6,95 e 7,83 ppm) quando comparados como os sinais destes prótons presentes nos espectros das díades em posição *meso*, sendo tal devido à proximidade destes ao grupo fenilo da posição 20 da porfirina que os protege devido ao seu efeito anisotrópico.

Relativamente à análise do espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 37), foi possível efetuar a identificação correta dos carbonos da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (18)** em posição β -pirrólica, sendo que a análise apoiada nos espectros de HSQC permitiu a identificação dos carbonos ligados diretamente a prótons.

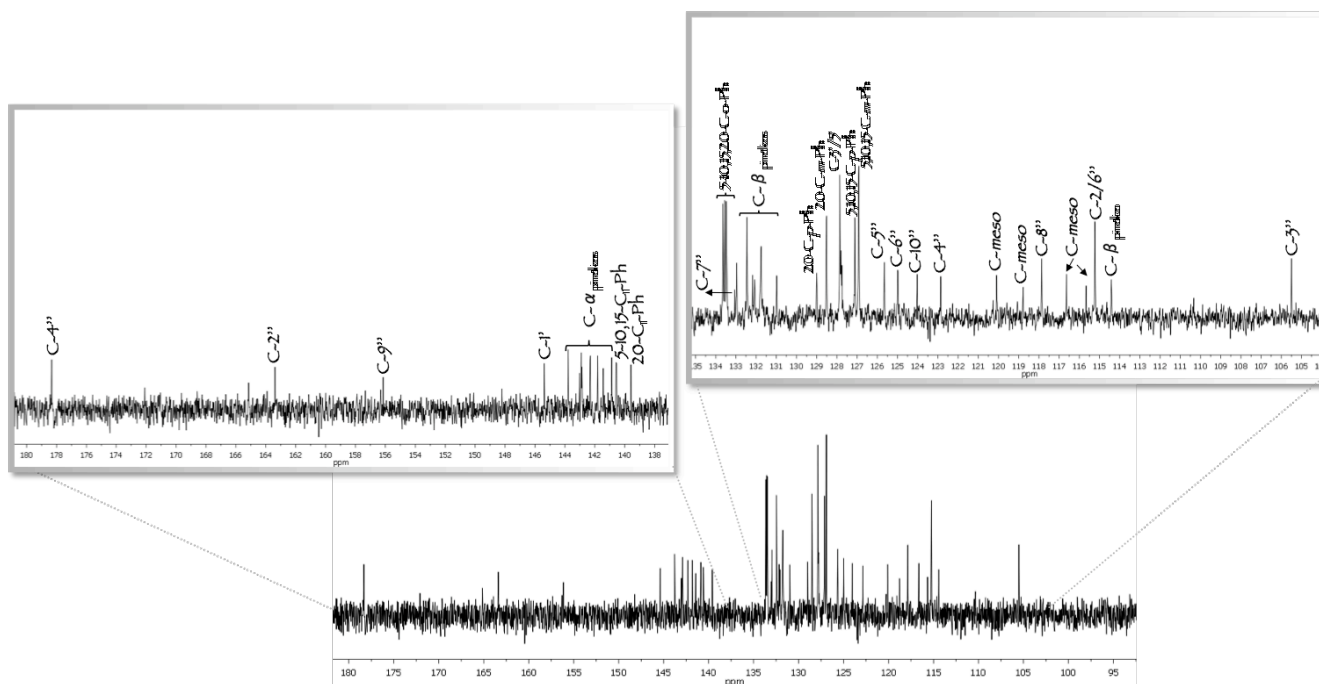


FIGURA 37. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

Pela análise dos espectros de HMBC foi possível a identificação dos carbonos quaternários presentes na estrutura desta díade (FIGURA 38). Os sinais gerados pela ressonância dos prótons C-1' e C-4' do anel B da flavona, foram identificados com sendo os sinais que surgem a δ 145,5 e 122,9 ppm. De entre estes dois carbonos verifica-se que o carbono C-1' é mais desprotegido, sendo tal devido ao facto de este se encontrar

diretamente ligado ao átomo de nitrogénio do grupo amino que o desprotege por indução.

Para o anel B da flavona são identificados dois carbonos quaternários, sendo que o sinal referente à ressonância do carbono C-2'' surge a δ 165,2 ppm e o sinal do carbono C-4'' surge a desvios característicos de um grupo carbonilo a δ 178,3 ppm.

Quanto aos restantes dos carbonos quaternários, os sinais referentes às suas ressonâncias surgem a δ 156,2 e 124,0 ppm, correspondendo aos carbonos C-9'' e C-10''. O carbono C-9'' apresenta-se como sendo o mais desprotegido, sendo que tal devido ao facto de este se encontrar ligado ao átomo de oxigénio do anel heterocíclico C que o desprotege por indução.

A análise por HMBC permitiu igualmente como para as díades anteriores, comprovar que a porfirina e o flavonoide se encontram ocooplados através do grupo amino da porfirina e o carbono C-1' do flavonoide, verificando-se que protão do grupo amino da porfirina apresenta correlações com o carbono C-3 da porfirina e com os carbonos C-2',6' da flavona (**FIGURA 38**).

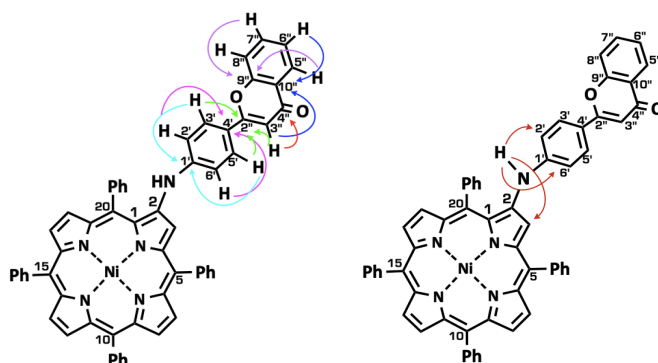


FIGURA 38. CONECTIVIDADES MAIS RELEVANTES OBSERVADAS NO ESPECTRO DE HMBC DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA.

O espectro de massa em HRMS - ESI comprova que o composto obtido se trata, mais uma vez, do composto pretendido, apresentando este um pico correspondente ao ião $[M^+]$ com uma razão m/z 905,2.

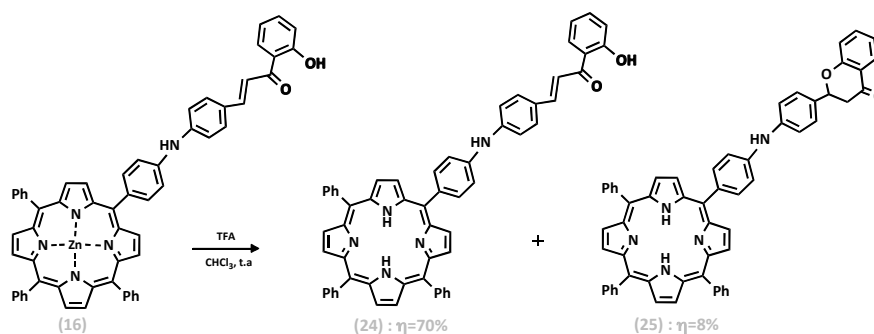
3.2.4. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE DESCOMPLEXADAS

Após a obtenção das quatro díades pretendidas ponderou-se a possível interferência do metal nos estudos de avaliação da atividade das díades e, como tal, procedeu-se à descomplexação das díades porfirina-flavonoide em posição *meso* e em posição β -pirrólica. Assim, as díades complexadas foram submetidas a condições reacionais acídicas tendo-se conseguido obter as quatro novas díades descomplexadas.

3.2.4.1. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO* DESCOMPLEXADAS

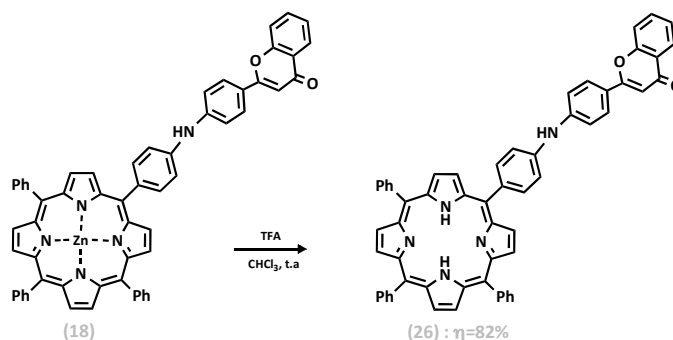
Inicialmente, procedeu-se à descomplexação das díades porfirina-flavonoide em posição *meso* (16) e (18), tendo-se para isso dissolvido estas díades em clorofórmio e em seguida adicionado ácido trifluoracético a 10%. Ambas as reações foram mantidas sob agitação magnética, à temperatura ambiente e controladas por TLC e por UV-Vis, sendo que ao fim de aproximadamente 20 minutos estas foram dadas por terminadas. O processo de finalização destas reações envolveu inicialmente a sua neutralização com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, seguindo-se da sua lavagem com água destilada e por fim a sua extração com clorofórmio. Após a remoção do solvente até à secura, os resíduos obtidos foram purificados recorrendo à cromatografia preparativa em camada fina.

Relativamente, ao processo de purificação da reação de descomplexação da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** em posição *meso*, foi utilizada uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:2) como eluente, tendo-se conseguido isolar três compostos, os quais foram identificados, do maior para o menor R_f , como sendo a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (24)** descomplexada, a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (25)** descomplexada e a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** de partida (**ESQUEMA 32**).



ESQUEMA 32. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (24) EM POSIÇÃO MESO DESCOMPLEXADA.

Quanto ao processo de purificação da reação de descomplexação da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** em posição *meso*, foi igualmente utilizado o mesmo eluente tendo-se isolado apenas um composto, o qual foi identificado como sendo a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (26)** descomplexada (ESQUEMA 33).



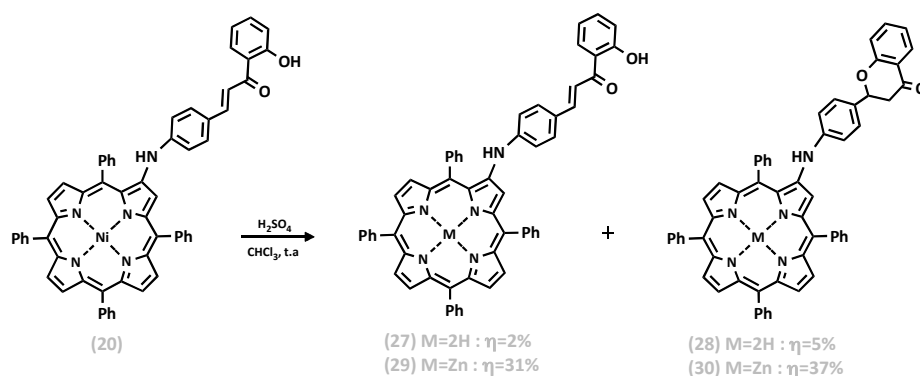
ESQUEMA 33. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (26) EM POSIÇÃO MESO DESCOMPLEXADA.

3.2.4.2. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADAS

Para proceder à descomplexação das díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica, foi necessário utilizar um ácido mais forte do que o TFA, uma vez que a remoção do níquel se apresenta mais complexa. Tal deve-se ao facto de o átomo de níquel ser um pouco menor do que átomo de zinco, acomodando-se este melhor no núcleo porfirínico. Assim, neste caso as díades complexadas (20) e (23) foram dissolvidas em clorofórmio sendo em seguida adicionado ácido sulfúrico a 10%. As reações foram mantidas sob agitação magnética e à temperatura ambiente, sendo que o controlo por

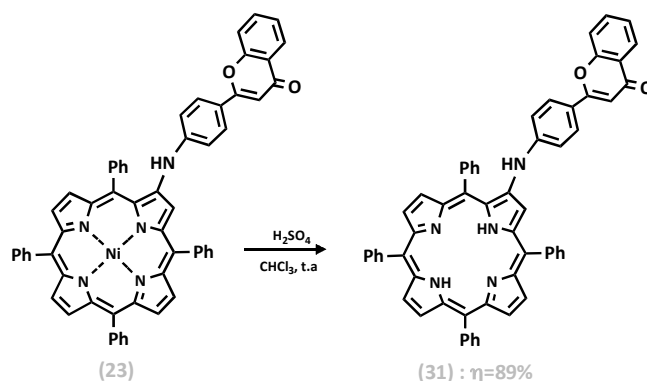
TLC e por UV-Vis permitiu ao fim de aproximadamente 20 minutos dar por terminadas estas reações. O termino de ambas as reações seguiu o procedimento normal de neutralização com uma solução saturada de hidróxido de sódio, lavagem com água destilada e extração com clorofórmio. Após a evaporação até à secura, os resíduos foram retomados em clorofórmio, sendo purificados recorrendo à cromatografia preparativa em camada fina.

No processo de purificação da reação de descomplexação da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** em posição β -pirrólica, foi utilizado como eluente uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:2), tendo-se conseguido isolar dois compostos, os quais foram identificados como sendo a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (27)** descomplexada com o maior R_f e a a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (28)** descomplexada com o menor R_f . Para além destas duas díades foram isoladas outras duas díades com menores R_f que as díades anteriores, a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (29)** e a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (30)**, as quais foram resultado da complexação das díades (27) e (28) com zinco mediante a utilização indevida de placas cromatográficas com indicador (**ESQUEMA 34**).



ESQUEMA 34. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-CALCONA (27) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADA.

Relativamente ao processo de purificação da reação de descomplexação da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** em posição β -pirrólica, foi igualmente utilizada uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:2) como eluente, tendo-se isolado um composto, o qual foi identificado com sendo a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (31)** descomplexada (**ESQUEMA 35**).



ESQUEMA 35. SÍNTESE DA DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (31) EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADA.

As novas díades descomplexadas sintetizadas foram igualmente caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis, espectroscopia de RMN monodimensional (RMN de ^1H) e espectrometria de massa (MALDI).

Pela análise dos espectros de visível, é possível observar que estas díades apresentam espectros de visível típicos de macrociclos livres, verificando-se uma banda a um comprimento de onda na região do UV referente aos flavonoides e cinco bandas a comprimentos de onda na região do visível referentes à porfirina. Assim, a presença de quatro bandas Q permite confirmar que o macrociclo porfirínico se encontra desprovido do metal.

Relativamente à análise dos espectros de RMN, observa-se pelo espectro de RMN de ^1H , que os estes se apresentam praticamente semelhantes aos espectros das díades complexadas apresentando igualmente os sinais referentes aos flavonoides assim como os sinais referentes à porfirina. Porém, neste caso verifica-se que surge um sinal entre δ -2 e -3 ppm o qual é referente à ressonância dos prótons internos do macrociclo porfirínico, sendo este sinal indicativo de que a porfirina se encontra na sua forma descomplexada.

Pela análise de massa em MALDI, verificou-se também um decréscimo da massa relativa comparativamente às díades complexadas, o qual é equivalente à perda da massa dos íons metálicos presentes nas díades.

Mediante os resultados espectroscópicos obtidos, é possível afirmar que os compostos obtidos se tratam das díades descomplexadas pretendidas.

3.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

Considerando o **OBJETIVO II**, uma vez sintetizadas as díades porfirina-flavonoide pretendidas procedeu-se à avaliação das suas propriedades fotofísicas, tendo em vista a sua potencial aplicação na terapia fotodinâmica e/ou no fotodiagnóstico.

Sabendo que os macrociclos tetrapirrólicos se apresentam como os compostos de eleição a usar na PDT e no PD, foi pertinente a sua escolha para a síntese das díades em estudo, mediante o facto de estas serem moléculas fluorescentes e de apresentarem a peculiaridade de se acumularem preferencialmente em células cancerígenas face às células normais.^[82] A escolha dos flavonoides como compostos a acoplar com as porfirinas, foi devido à possibilidade destes compostos apresentarem atividade anticancerígena, sendo que por outro lado estes não suscitam citotoxicidade significativa para as células humanas normais.^[33]

Sabendo que a terapia fotodinâmica assim como o fotodiagnóstico tiram partido da ação conjugada de uma molécula fotoexcitada e da aplicação de luz, será importante referir os processos fotofísicos envolvidos em ambas as técnicas.

O diagrama de Jablonski, representa o "trajeto" percorrido desde que uma molécula no estado fundamental absorve luz de uma dada energia até retornar novamente ao estado fundamental, mais estável e de menor energia (**FIGURA 39**).^[83]

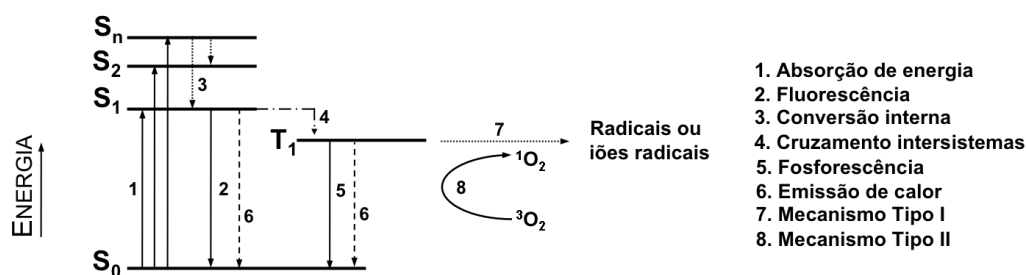


FIGURA 39. DIAGRAMA DE JABLONSKI MODIFICADO.^[83]

Dependendo da energia incidente, a molécula pode ser promovida ao primeiro estado excitado singuleto (S_1) ou a um estado excitado singuleto de energia superior pela transição do eletrão para um nível eletrónico ($S_2...S_n$) mais alto. Quando o estado singuleto ocupado corresponde a $n > 1$, o eletrão decai através de processos de conversão interna para o estado excitado singuleto de menor energia (S_1). Encontrando-se o eletrão neste estado excitado o seu decaimento pode ocorrer de duas maneiras distintas:

- o eletrão sofre um decaimento para o estado fundamental (S_0) com emissão de radiação (fluorescência) ou com emissão de calor; ou

- o eletrão é conduzido, via cruzamento intersistemas, ao estado excitado tripleto (T_1). Neste estado, o eletrão pode posteriormente decair para o estado fundamental (S_0) com emissão de radiação (fosforescência) ou mais uma vez por emissão de calor. Pode também ocorrer, que a molécula no estado excitado tripleto (T_1) transfira a sua energia para outra que esteja no estado fundamental (T_0), promovendo a sua excitação para um estado de energia mais alto, designando-se este processo por reação de fotossensibilização.

No caso concreto da PDT, o seu modo terapêutico é iniciado pela irradiação do PS, sendo este promovido a um estado excitado singuleto. Posteriormente, se o seu decaimento energético ocorrer preferencialmente via conversão intersistemas verifica-se a formação do estado excitado tripleto do PS.^[84] Uma vez neste estado, podem ocorrer dois mecanismos distintos de fototoxicidade:

- Mecanismo Tipo I - o PS pode interagir com as moléculas vizinhas com abstração de um eletrão ou protão originando espécies radicalares, as quais provocam danos celulares; ou

- Mecanismo Tipo II - o PS transfere a sua energia para o oxigénio molecular (3O_2), ocorrendo a formação de oxigénio singuleto (1O_2). Esta espécie é bastante citotóxica e um oxidante muito poderoso, pelo que se presume que esta seja a espécie envolvida na reação com as células cancerígenas e que promove a sua morte celular.

Relativamente ao fotodiagnóstico, este rege-se pelos mesmos princípios que a PDT, tirando igualmente partido das propriedades fotofísicas do PS. Porém, neste caso, o PS não deverá sofrer cruzamento intersistemas mas sim decair preferencialmente após excitação por fluorescência para o estado fundamental (S_0).

O comportamento fotofísico das moléculas pode se quantificado em termos de rendimento quântico, o qual representa para qualquer processo a razão entre o número de fotões "em jogo" (n_{fp}) e o número total de fotões absorvidos pela molécula (n_{fa}):

$$\Phi = (n_{fp}) / (n_{fa})$$

A título de exemplo, se uma molécula apresenta um rendimento quântico de fluorescência de 0,5 pode-se dizer que 50% dos fotões absorvidos sofreram decaimento radiativo diretamente do estado excitado singuleto para o estado fundamental com emissão de fluorescência.^[81]

É também importante referir, que a soma dos rendimentos quânticos de todos os processos que envolvem a participação de fotões como a fluorescência Φ_f , fosforescência Φ_p e estado singuleto Φ_s é inferior ou igual à unidade:

$$\Sigma \Phi \leq 1$$

Em suma, podemos considerar que os compostos passíveis de serem usados na PDT devem apresentar caraterísticas que favoreçam a formação de 1O_2 ao invés da emissão por fluorescência. Por outro lado, os compostos a utilizar no fotodiagnóstico não devem apresentar produção de 1O_2 e ter como preferência a emissão por fluorescência.

Como é possível verificar, o estudo das propriedades fotofísicas dos compostos permite avaliar se os compostos apresentam as caraterísticas necessárias para a sua potencial utilização nas técnicas referidas. Posto isto, procedeu-se à avaliação de algumas propriedades fotofísicas das díades, nomeadamente a sua emissão por fluorescência (determinando o rendimento quântico de fluorescência) e a produção de oxigénio singuleto (monitorizando a fotodegradação do DFIBF).

3.3.1. AVALIAÇÃO DA EMISSÃO POR FLUORESCÊNCIA

O estudo das propriedades fotofísicas, iniciou-se pela avaliação da emissão por fluorescência dos compostos sintetizados, tendo-se primeiramente procedido ao registo dos espectros de fluorescência referentes às soluções em DMF das díades porfirina-flavonoide em posição *meso* complexadas (16 - 18) e descomplexadas (24 - 26). As soluções em DMF de cada díade foram excitadas a λ 550 nm, sendo registados os espectros de fluorescência entre 600 e 850 nm, à temperatura de 20 °C e em condições aeróbicas.

Os espectros de emissão das soluções em DMF das díades porfirina-flavonoide em posição *meso* complexadas (16 - 18) são caracterizados pela existência de duas bandas de emissão a aproximadamente 611 e 659 nm. De igual modo, os espectros de emissão das soluções em DMF das díades porfirina-flavonoide em posição *meso* descomplexadas (24 - 26) são caracterizados pela existência de duas bandas de emissão, surgindo estas a aproximadamente 658 e 719 nm (FIGURA 40).

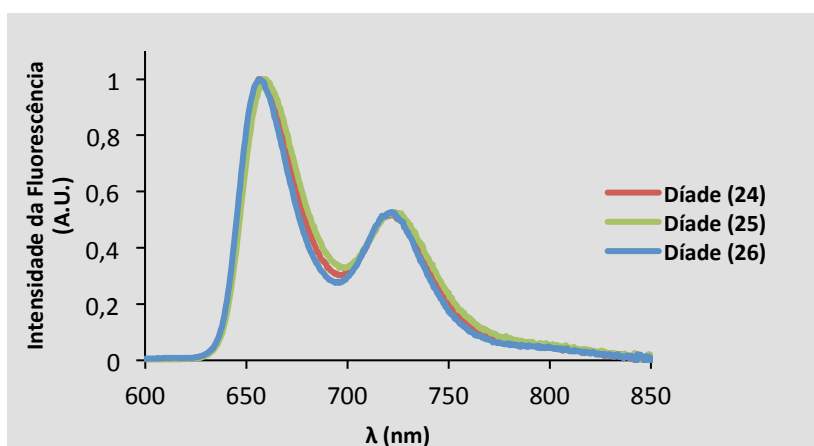


FIGURA 40. ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA NORMALIZADOS DAS SOLUÇÕES EM DMF DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO* DESCOMPLEXADAS (24 - 26).

Para a determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) das díades, foi utilizada a **TPP (9)** como porfirina de referência, mediante o facto de esta se tratar da porfirina de base utilizada para a síntese das díades pretendidas e para a qual é conhecido o rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_f = 0,12$, em DMF).^[85] Assim, uma

vez obtidos os espectros de emissão das díades e da porfirina de referência, foram calculadas as áreas de cada espectro e determinado o rendimento quântico de fluorescência de cada díade, usando seguinte equação:^[86]

$$\Phi_{fl}^{amostra} = \Phi_{fl}^{ref} \frac{AUC^{amostra} (1 - 10^{-Abs_{ref}})}{AUC^{ref} (1 - 10^{-Abs_{amostra}})}, \text{ em que}$$

$\Phi_{fl}^{amostra}$	rendimento quântico de fluorescência da amostra;
Φ_{fl}^{ref}	rendimento quântico de fluorescência da referência;
$AUC^{amostra}$	área do espectro de emissão da amostra;
AUC^{ref}	área do espectro de emissão da referência;
$Abs_{amostra}$	densidade ótica da amostra;
Abs_{ref}	densidade ótica da referência.

Os rendimentos quânticos de fluorescência determinados para as soluções em DMF das díades porfirina-flavonoide em posição *meso* complexadas (16 - 18) e descomplexadas (24 - 26) encontram-se seguidamente apresentados (TABELA 1).

TABELA 1. PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS SOLUÇÕES EM DMF DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO* COMPLEXADAS (16-18) E DESCOMPLEXADAS (24-26).

	DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE	EMIÇÃO (nm)	Φ_f
COMPLEXADAS	DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)	612, 658	0,04
	DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)	612, 661	0,02
	DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)	610, 660	0,07
DESCOMPLEXADAS	DÍADE PORFIRINA-CALCONA (24)	658, 720	0,17
	DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (25)	659, 722	0,16
	DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (26)	659, 796	0,20

*A densidade óptica das soluções em DMF das díades e da TPP foi de 0,02 a $\lambda_{exc} = 550$ nm.

**A TPP foi utilizada como referência com um $\Phi_f = 0,12$ em DMF.^[85]

Pelos resultados obtidos, observa-se que todas as díades porfirina-flavonoide em posição *meso* apresentam emissão por fluorescência. As díades complexadas (16-18) apresentam um rendimento quântico de fluorescência bastante inferior comparativamente à TPP e às díades descomplexadas. Este comportamento já foi verificado em outros derivados complexados assim como para a **Zn(II)-TPP** a qual apresenta um $\Phi_{fl} = 0,03-0,033$.^{[87][85]} As díades descomplexadas (24-26) apresentam rendimentos quânticos de fluorescência superiores à **TPP (9)**, pelo que podemos considerar que o flavonoide induz um aumento na fluorescência. Perante estes resultados, as díades descomplexadas (24-26) apresentam-se como potenciais candidatos a serem utilizadas no fotodignóstico.

Para as díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica complexadas (20, 22 e 23) e descomplexadas (27, 28 e 31), foi igualmente avaliada a sua emissão por fluorescência, tendo sido registados os respetivos espectros de emissão aquando a excitação das soluções em DMF destas díades a λ_{exc} 580 nm. Os espectros de fluorescência foram registados entre 600 e 850 nm, a uma temperatura de 20 °C e em condições aeróbicas.

Os rendimentos quânticos de fluorescência das díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica foram igualmente calculados e encontram-se resumidos na **TABELA 2** juntamente com as suas principais características espectroscópicas.

TABELA 2. PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS SOLUÇÕES EM DMF DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA COMPLEXADAS (20, 22 E 23) E DESCOMPLEXADAS (27, 28 E 31).

	DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE	EMIÇÃO (nm)	Φ_{fl}
COMPLEXADAS	DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)	--	--
	DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22)	--	--
	DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)	--	--
DESCOMPLEXADAS	DÍADE PORFIRINA-CALCONA (27)	663, 731	0,04
	DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (28)	661, 732	0,04
	DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (31)	661, 730	0,06

*A densidade óptica das soluções em DMF das díades e da TPP foi de 0,02 em DMF a λ_{exc} = 580 nm.

**A TPP foi utilizada como referência com um $\Phi = 0,12$ em DMF.^[85]

Para as díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica complexadas (20, 22 e 23) não foi detetada emissão por fluorescência. Tal facto, encontra-se em concordância com o descrito na literatura mediante a capacidade de quencher exibida pelos complexos de Ni(II).^[88] Contrariamente, as díades em posição β -pirrólica descomplexadas (27, 28 e 31) apresentam emissão por fluorescência, verificando-se que o facto de o flavonoide se encontrar substituído na posição β -pirrólica da porfirina influencia a emissão por fluorescência por parte destes compostos.

3.3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÉNIO SINGULETO

Para proceder ao estudo da produção de oxigénio singuleto das díades porfirina-flavonoide, foi realizada uma monitorização qualitativa da fotodegradação do 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF). A produção de $^1\text{O}_2$ por parte do fotossensibilizador, promove a que o DFiBF de cor amarela, sofra uma reação de cicloadição [4+2], havendo a formação do *orto*-dibenzoilbenzeno (ODB) que é incolor (FIGURA 41).^[89]

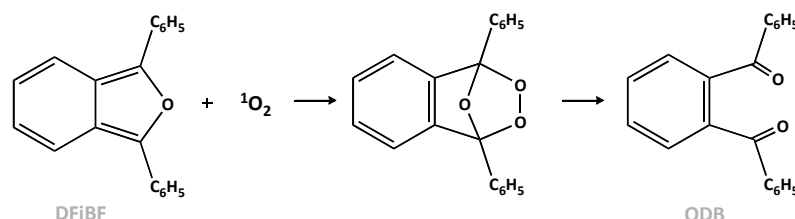


FIGURA 41. FOTODEGRADAÇÃO DO DFiBF.

Uma vez que o DFiBF apresenta uma banda de absorção a λ 415 nm, torna-se possível observar a capacidade de produção de $^1\text{O}_2$ por parte do fotossensibilizador mediante o decaimento da sua absorção a este comprimento de onda.^[90] Assim, para proceder a este estudo, num célula espectrofotométrica contendo DMF foram adicionados 0,5 μM das soluções stock das díades em DMF e em seguida adicionados 50 μM DFiBF. É de salientar que a concentração de DFiBF é 100 vezes superior à concentração das díades por forma a permitir uma melhor visualização do decaimento da sua banda. Após a adição de DFiBF, as amostras são sujeitas a irradiação vermelha

proveniente de uma fonte de luz composta por 25 LEDs vermelhos de alto brilho (640 ± 20 nm), sendo registados a cada minuto os respetivos valores de absorvância das soluções em estudo a λ 415 nm.

Este estudo, foi iniciado pela avaliação da produção de oxigénio singuleto das díades porfirina-flavonoide em posição *meso* complexadas (16 - 18) e descomplexadas (24 - 26). Os resultados obtidos encontram-se representados na FIGURA 42, sendo que quanto mais pronunciado for o declive da recta maior é a produção de oxigénio singuleto.

É importante referir, que primeiramente este procedimento foi aplicado à porfirina de referência TPP (9) por forma a ter uma base de comparação do efeito do DFIBF nesta porfirina nas mesmas condições experimentais que para as díades e pelo facto desta apresentar uma boa capacidade em produzir oxigénio singuleto ($\Phi_{\Delta} = 0,65$ em DMF).^[85] Este procedimento, foi também inicialmente realizado para uma solução contendo apenas DFIBF, tendo-se verificado que a sua exposição a irradiação provoca somente uma ligeira fotodegradação deste composto. Este ensaio permite ainda verificar que caso nos ensaios utilizando as díades se observe uma diminuição da banda de absorção do DFIBF esta será devida à formação de $^1\text{O}_2$ por parte do fotossensibilizador e não apenas sua própria fotodegradação.

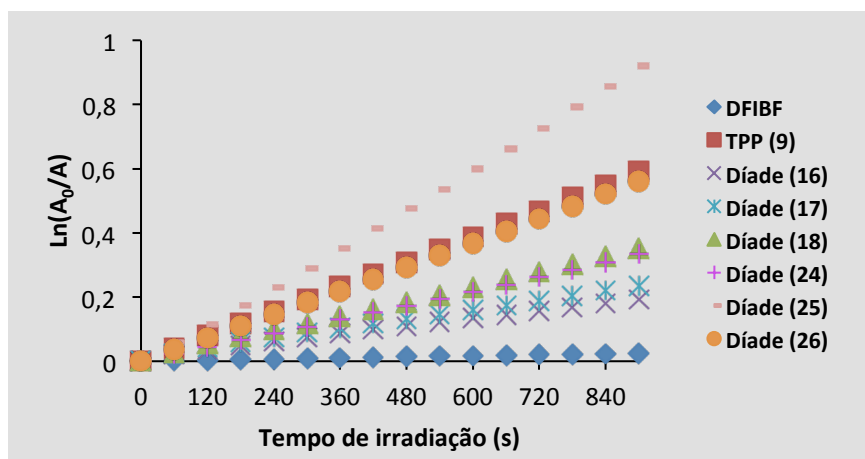


FIGURA 42. FOTODEGRADAÇÃO DO DFIBF (50 µM) EM DMF AO LONGO DO TEMPO, APÓS IRRADIAÇÃO COM UM LUZ VERMELHA DE POTÊNCIA $9,0 \text{ mW cm}^{-2}$ NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO MESO (0,5 µM).

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que todas as díades porfirina-flavonoide em posição *meso* apresentam capacidade para produzir oxigénio singuleto. De entre estas, destaca-se a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (25)** descomplexada, a qual apresenta uma melhor produção de $^1\text{O}_2$ do que a porfirina de referência. A **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (26)** descomplexada verifica-se que exibe praticamente a mesma capacidade de produção de $^1\text{O}_2$ que a **TPP (9)**, sendo que as restantes díades apresentam uma menor eficiência em gerar $^1\text{O}_2$ comparativamente à referência.

Perante estes resultados, as díades porfirina-flavonoide em posição *meso* descomplexadas (24 - 26) surgem como potenciais candidatos a utilizar como fotossensibilizadores na PDT de tumores.

Mediante os valores obtidos quer de rendimento quântico de fluorescência e de produção de oxigénio singuleto por parte das díades porfirina-flavonoide em posição *meso*, é possível fazer uma distinção entre as díades complexadas e as descomplexadas, observando-se pela **FIGURA 43** a existência de dois grupos diferenciados. Assim, pode-se considerar que as díades em *meso* complexadas (16 - 18) apresentam um Φ_{fl} e uma produção de oxigénio singuleto inferiores ao precursor **TPP (9)**. Para as díades em posição *meso* descomplexadas (24 - 26) verifica-se que apresentam um Φ_{fl} superior em relação à **TPP (9)**.

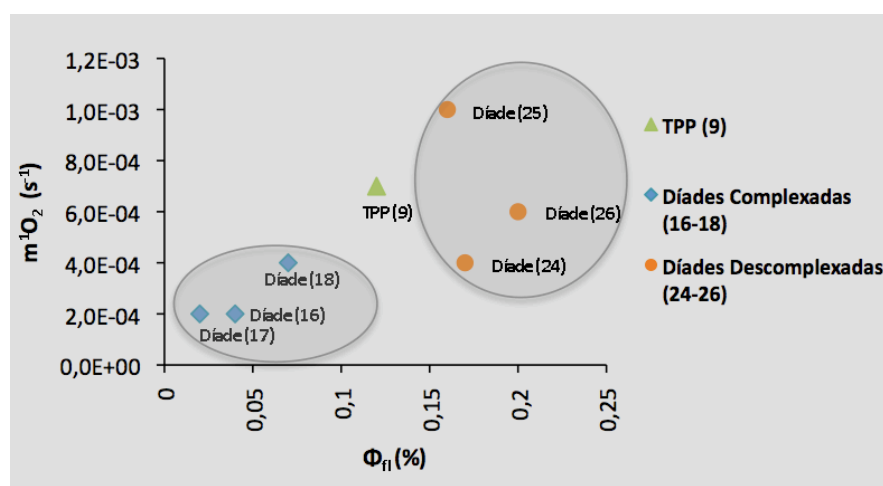


FIGURA 43. TAXA DE OXIDAÇÃO DO DFIBF VS RENDIMENTO QUÂNTICO DE FLUORESCÊNCIA DAS DÍADES EM POSIÇÃO *MESO* complexadas (16-18) e descomplexadas (24-26), EM DMF.

Para proceder à avaliação da produção de oxigénio singuleto das díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica complexadas (20, 22 e 23) e descomplexadas (27, 28 e 31), foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, encontrando-se os resultados obtidos para estas díades apresentados na FIGURA 44.

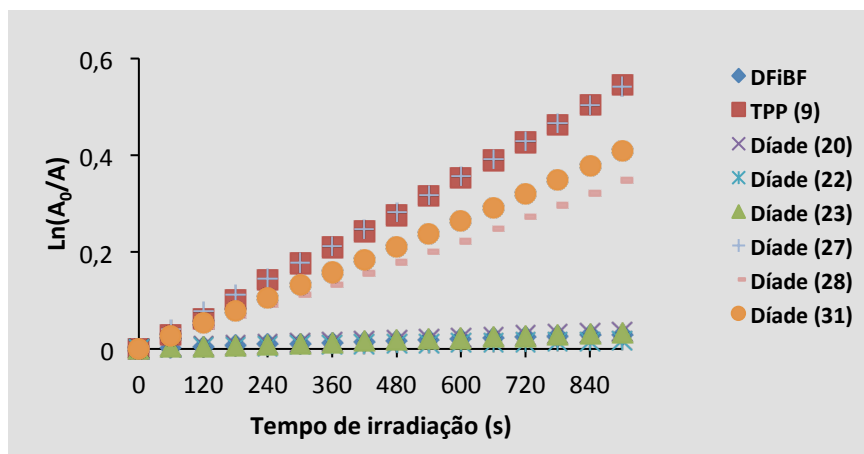


FIGURA 44. FOTODEGRADAÇÃO DO DFIBF (50 μM) EM DMF AO LONGO DO TEMPO, APÓS IRRADIAÇÃO COM LUZ VERMELHA DE POTÊNCIA 9,0 mW cm^{-2} NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA (0,5 μM).

Pelos resultados obtidos para as díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica, verifica-se que nem todas as díades são produtoras de oxigénio singuleto. As díades complexadas (20, 22 e 23) não apresentam a capacidade de produzir $^1\text{O}_2$, sendo tal facto explicado pelo efeito de quencher exibido pelos complexos de Ni(II).^[88] Por ser turno, as díades descomplexadas (27, 28 e 31) apresentam capacidade de produzir $^1\text{O}_2$, sendo a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (27)** aquela que surge com o melhor resultado exibindo com um comportamento praticamente igual à **TPP (9)**. Posto isto, podemos verificar que apenas as díades em posição β -pirrólica descomplexadas são capazes de gerar $^1\text{O}_2$, surgindo assim como potenciais fotossensibilizadores a utilizar na PDT de tumores.

Perante os resultados fotofísicos apresentados pelas díades complexadas com Ni(II) (20, 22 e 23), em que se observa que não apresentam qualquer uma das características essenciais para a sua utilização quer em PDT quer em PD, foi realizado um estudo

complementar em que se procedeu à avaliação da sua capacidade intercalante de ADN, podendo estas desta forma atuar como agentes antitumorais por outra via.

Atualmente, verifica-se que apesar dos progressos desenvolvidos no tratamento do cancro, esta doença continua a ser responsável por uma elevada taxa de mortalidade a nível mundial. Tal facto, deve-se essencialmente à elevada toxicidade e à baixa especificidade apresentada pelos fármacos anti-tumorais existentes. Perante esta situação e o facto de que a maioria dos fármacos anti-tumorais apresentam como alvo o ADN, são inúmeros os investigadores que procuram cada vez mais compreender a interação entre os fármacos e o ADN, tendo como foco principal o desenvolvimento de novos e eficientes fármacos.^[91]

A interação de moléculas com o ADN pode ocorrer através de modos distintos, onde podemos considerar que existem três diferentes modos de ligação: intercalação entre os pares de base, por ligação nos *grooves* (maior ou menor) ou por uma ligação externa ao ADN através de interações electrostáticas. Nestes três modos de ligação, as ligações são estabilizadas por diferentes interações associativas como as ligações hidrofóbicas, as pontes de hidrogénio, as interações π e por forças de van der Waals.^[92]

Os fármacos que atuam como agentes intercalantes de ADN são normalmente compostos com sistemas aromáticos ou heteroaromáticos planares capazes de se intercalarem de forma reversível entre os pares de base do ADN.^[93] O processo de intercalação inicia-se com a transferência do agente intercalante do meio aquoso para o meio hidrofóbico entre dois pares de bases alternados e de um modo perpendicular ao eixo do ADN (FIGURA 45). Este processo é termodinamicamente favorável devido ao aumento da entropia do sistema, uma vez que as moléculas de água perdem a organização em torno do agente intercalante.^{[94] [95]}

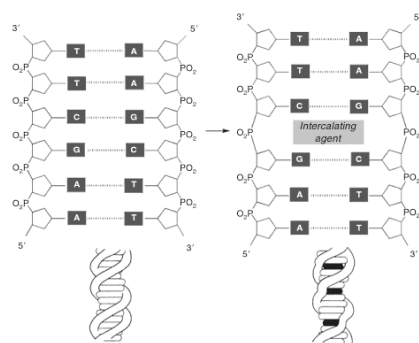


FIGURA 45. ILUSTRAÇÃO DA INTERCALAÇÃO DO ADN POR UM AGENTE INTERCALANTE.

Durante o processo de intercalação ocorrem diversas deformações do ADN nomeadamente, um desenrolamento parcial da dupla hélice, um aumento vertical do espaço entre os pares de base e a consequente alteração dos ângulos de torção, e distorções na estrutura da desoxirribose. Estas deformações permitem acomodar o agente intercalante na estrutura do ADN, formando-se um complexo no qual a sua estabilidade é otimizada perante a diminuição das forças de repulsão de Coulomb entre os grupos fosfato do ADN, a existência de interações não covalentes (van der Waals e interações π), de pontes de hidrogénio e de ligações iónicas entre grupos carregados positivamente do agente intercalante e os grupos fosfato do ADN.^[93] Perante as deformações ocorridas na estrutura do ADN, ocorrem interferências no processo de reconhecimento e no desempenho das proteínas associadas ao ADN, o que influencia importantes processos como a transcrição e a replicação do ADN. Assim, a aplicabilidade destes compostos intercalantes tem sido avaliada para além de agentes antitumorais como agentes mutagénicos, antibióticos e antimicrobianos.^[96]

3.2.3. AVALIAÇÃO DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE COMPLEXADAS COMO AGENTES INTERCALANTES DE ADN

A avaliação das díades como potenciais agentes intercalantes, prende-se pelo facto de, como já referido, os flavonoides assim como as porfirinas exibirem atividade anticancerígena. Por outro lado, as díades apresentam a estrutura necessária de um bom agente intercalante contendo estas uma estrutura com sistemas aromáticos e heteroaromáticos planares, sendo esta planaridade ainda acrescida pelo facto das díades se encontrarem complexadas com o Ni(II), que como já referido este metal se acomoda perfeitamente no núcleo porfirínico.^[97]

Atualmente, são vários os métodos utilizados em estudos de intercalação de ADN, porém entre as várias técnicas existentes neste trabalho recorreu-se à espectroscopia de UV-Vis uma vez que esta tem demonstrado ser bastante eficiente na avaliação de propriedades intercalantes de diversos compostos.^[98]

O estudo de intercalação por UV-Vis permite verificar que se ocorrer intercalação entre os pares de base do ADN, se observa um desvio da banda Soret para comprimentos

de onda maiores (desvio batocrômico) > 10 nm e um decréscimo na absorvância desta banda (hipocromismo) superior a 40%, sendo que se ocorrer uma ligação externa ao ADN verificam-se as mesmas modificações espectrais mas menos pronunciadas. Por outro lado, se o processo de ligação ocorrer nos *grooves* do ADN verificam-se ligeiras ou praticamente nenhuma alterações do espectro de UV-Vis.^[82]

A determinação da percentagem de hipocromismo pode ser calculada pela seguinte equação:^[99]

$$H = \frac{OD_f - OD_b}{OD_f} \times 100, \text{ em que}$$

OD_f densidade ótica do composto livre a um determinado comp. de onda;

OD_b densidade ótica do composto ligado ao ADN a um determinado comp. de onda.

Os estudos desenvolvidos sobre intercalação de porfirinas com o ADN, têm sido mais intensivos no que diz respeito à utilização de porfirinas catiónicas, uma vez que estas sendo compostos anfifílicos e solúveis em água apresentam uma afinidade natural para com os sistemas intracelulares, principalmente com o ADN. De entre as porfirinas catiónicas, a tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina - **TMPyP (32)** é aquela que tem suscitado um maior interesse uma vez que apresenta uma elevada interação como o ADN, nomeadamente em termos de intercalação (FIGURA 46).^[100] Perante isto, no presente trabalho a **TMPyP (32)** foi a porfirina utilizada como referência nos estudos de intercalação.

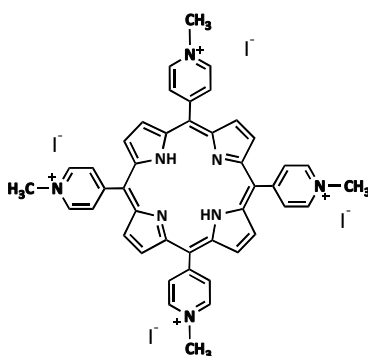


FIGURA 46. ESTRUTURA DA TETRAIODETO DE 5,10,15,20-TETRAQUIS(1-METILPIRIDÍNIO-4-IL)PORFIRINA - **TMPyP (32)**.

Para proceder aos estudos de intercalação, inicialmente foi preparada uma solução de ADN de Calf Thymus (CT ADN) em uma solução tampão de Tris-HCl, sendo em seguida registado o seu espectro de UV-Vis, em que se observa a presença de uma banda de absorção a λ 260 nm a qual é referente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos sistemas aromáticos das bases azotadas do ADN.^[101]

Em seguida, foi então testada a capacidade intercalante da **TMPyP (32)** com o ADN num solução tampão de Tris-HCl, procedendo-se para isso a uma titulação, em que numa célula espetofotométrica de quartzo contendo Tris-HCl e **TMPyP (32)** a uma concentração de 9 μ M, foram posteriormente adicionados volumes equivalentes da solução de CT ADN em Tris-HCl, sendo que por cada adição a solução foi mantida sob agitação magnética durante 10 minutos, a uma temperatura de 20 °C e registado o respetivo espectro de UV-Vis após este período de tempo (**FIGURA 47**).

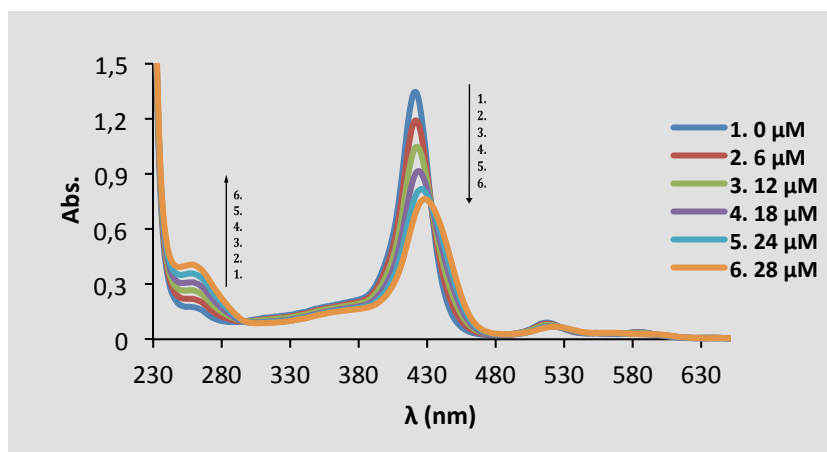


FIGURA 47. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA **TMPyP (32)** [9 μ M] EM SOLUÇÃO TAMPÃO TRIS-HCl EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE CT ADN. A SETA REFLETE AS ALTERAÇÕES NA ABSORVÂNCIA COM O AUMENTO DA [CT ADN].

Pelos resultados obtidos para a **TMPyP (32)** em Tris-HCl, podemos verificar que com o aumento da [CT ADN] se observa um desvio batocrómico de 7 nm da banda Soret e uma percentagem de hipocromismo de 43,3%. Perantes estes resultados, que vão de encontro aos descritos na literatura, podemos concluir que a **TMPyP (32)** em Tris-HCl apresenta capacidade para se intercalar entre os pares de base do CT ADN.

Pelo espectro de UV-Vis em Tris-HCl observa-se também que com o aumento da [CT ADN] ocorre um aumento referente à banda de ADN a λ 260 nm, como seria de esperar.

O procedimento descrito anteriormente para a **TMPP (32)** foi em seguida aplicado utilizando as díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica complexadas. Contudo, como as díades sintetizadas neste trabalho não são catiónicas como a **TMPP (32)** procedeu-se a um estudo de solventes que permitissem a avaliação da capacidade de intercalação do ADN por parte destes derivados, mediante a sua não solubilidade em solventes aquosos como a solução tampão de Tris-HCl, observando-se a sua precipitação neste solvente. Perante esta adversidade, foram investigadas novas alternativas e pesquisados solventes utilizados em estudos de intercalação de ADN, tendo-se observado em alguns estudos reportados a utilização de solventes orgânicos como a DMF e o DMSO, ao invés de solventes aquosos.

Uma vez que as díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica complexadas com Ni(II) (**20**) e (**23**) nos solventes referidos já não apresentam problemas de solubilidade, foi adotada esta nova abordagem, tendo-se optado pela utilização da DMF como solvente para realizar os estudos de intercalação.

Assim, tal como na primeira abordagem foi inicialmente testada a capacidade intercalante de ADN da **TMPP (32)** em DMF, servindo este ensaio como controlo deste método. Para tal, foi feita uma titulação da **TMPP (32)** em DMF, sendo feitas adições regulares da solução de CT ADN em Tris-HCl, pelo que por cada adição a solução foi mantida sob agitação magnética durante 10 minutos e a uma temperatura de 20 °C e após este período de tempo registado o respetivo espectro de UV-Vis (**FIGURA 48**).

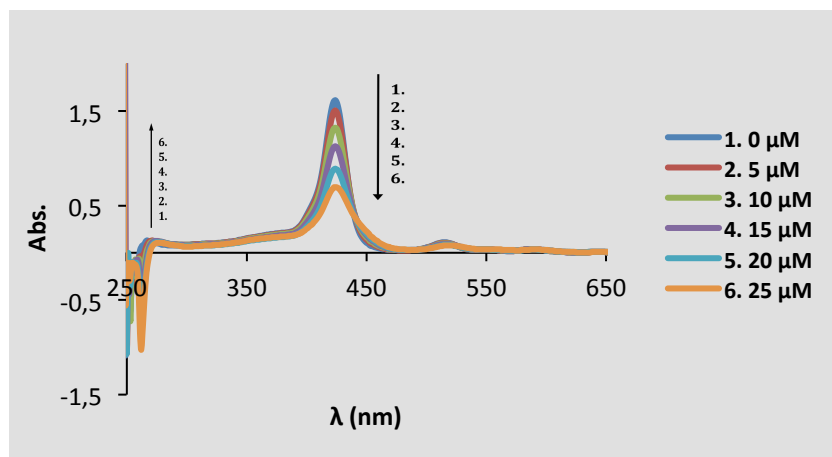


FIGURA 48. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA TMPyP (32) [9 μM] EM DMF EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE CT ADN. A SETA REFLETE AS ALTERAÇÕES A ABSORVÂNCIA COM O AUMENTO DA [CT ADN].

Pelos resultados obtidos para a **TMPyP (32)** em DMF, podemos verificar que com o aumento da [CT ADN] não se observa qualquer desvio batocrômico da banda Soret, observando-se contudo que ocorre um hipocromismo de 56,8% desta mesma banda. Assim, apesar de não se verificar um desvio batocrômico, podemos considerar que em termos de hipocromismo os resultados se apresentam semelhantes aos obtidos no ensaio em Tris-HCl, pelo que se pode concluir que a **TMPyP (32)** em DMF também exibe a capacidade para se intercalar entre os pares de base do CT ADN, encontrando-se assim este método também validado. Neste ensaio, verifica-se que para além da banda referente ao ADN a λ 260 nm surge uma banda invertida a λ 262 nm, a qual é igualmente referente ao ADN.

Como os resultados obtidos por este novo método para a porfirina de referência foram consistentes utilizando a nova abordagem, esta foi igualmente aplicada aos precursores das díades assim como para as díades complexadas com Ni(II). Seguidamente, são apresentados os espectros de UV-Vis obtidos em cada um dos respetivos ensaios de intercalação de ADN (**FIGURA 49 E 50**).

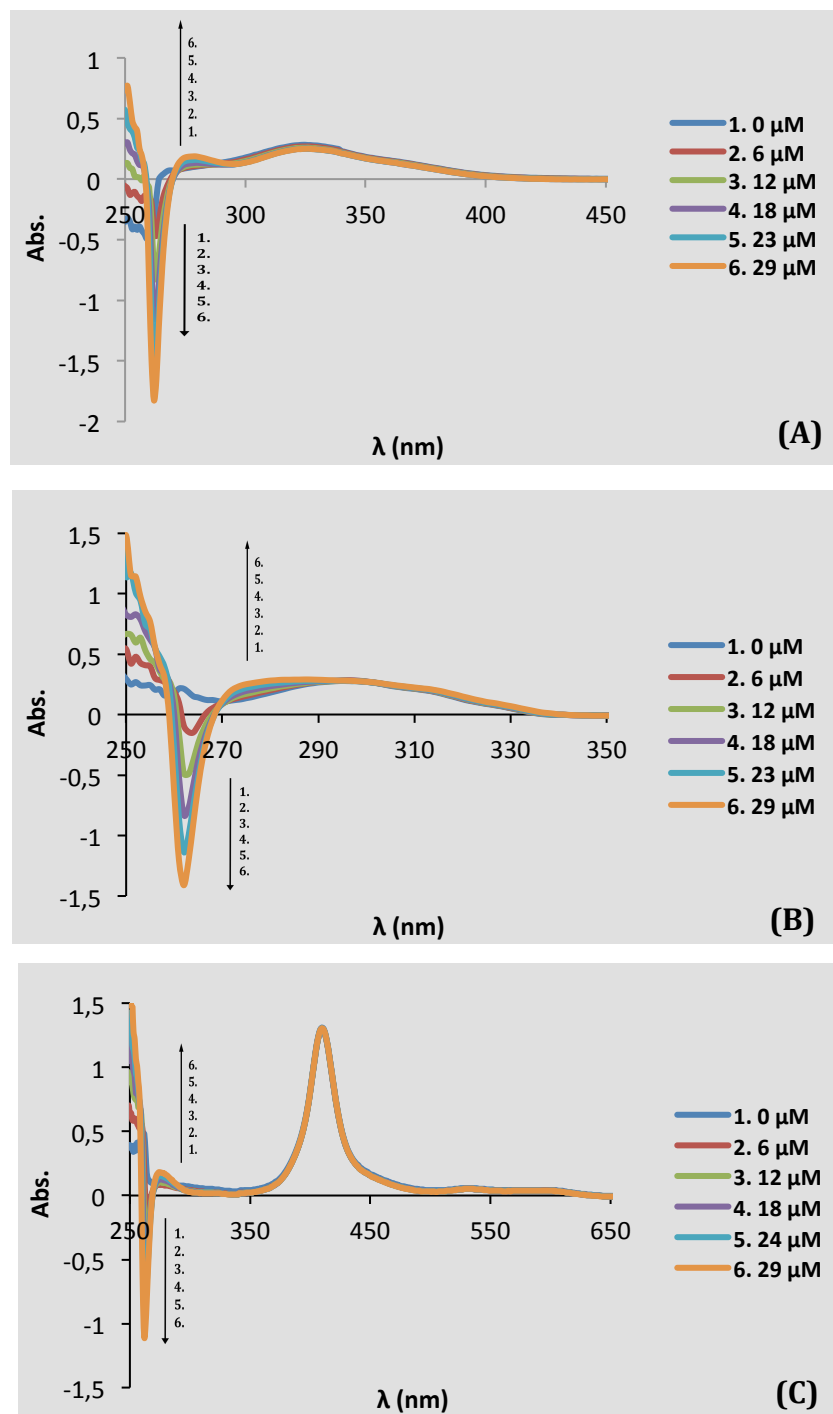


FIGURA 49. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA (A) 4-BROMO-2'-HIDROXI-CALCONA (7), (B) 4'-BROMOFLAVONA (8) E (C) Ni(II)-NH₂TPP (15) EM DMF NA PRESENÇA DE CTADN. AS SETAS REFLETEM O AUMENTO DA [CTADN].

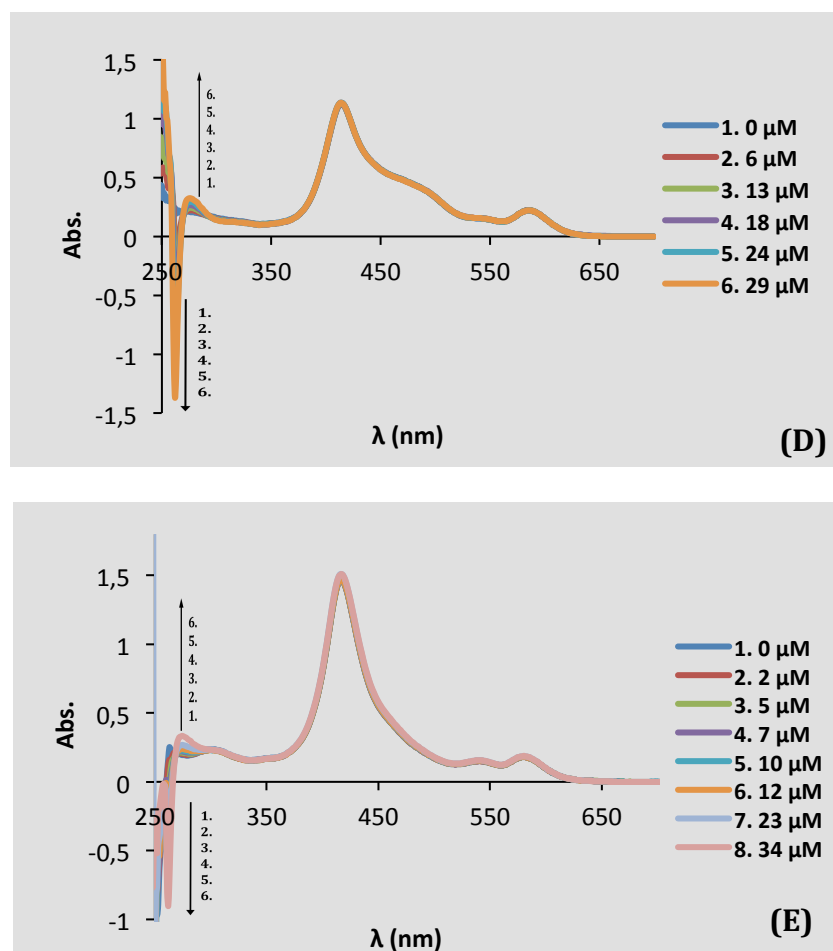


FIGURA 50. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA (D) DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) E DA (E) DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) EM DMF EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE CT ADN. AS SETAS REFLETEM O AUMENTO DA [CT ADN].

Pelos resultados obtidos nesta nova abordagem utilizando a DMF como solvente, podemos verificar que com o aumento da [CT ADN] não se observa praticamente nenhuma alteração nos respetivos espectros de UV-Vis nomeadamente em termos de desvio batocrómico e de hipocromismo. Deste modo, pode-se excluir a hipótese de que a ligação destes cinco compostos em estudo ao ADN tenha ocorrido por intercalação entre os pares do ADN ou no exterior do ADN, não podendo no entanto excluir a hipótese de ter ocorrido uma ligação numa das *grooves* do ADN tal como referenciado.^[82] Contudo, este estudo não é por si só conclusivo de que tenha ocorrido ligação numa das *grooves* do ADN pelo que seria necessário recorrer a outras técnicas para a realização de novos estudos.

Mediante estes resultados não conclusivos obtidos no estudo de intercalação em DMF, repetiram-se as titulações espectrofotométricas utilizando o DMSO como solvente. Assim, tal como para o ensaio anterior foi inicialmente testada a capacidade intercalante de ADN da **TMPyP (32)** neste solvente por forma a validar a capacidade de deteção de intercalação de ADN, encontrando-se os resultados na **FIGURA 51**.

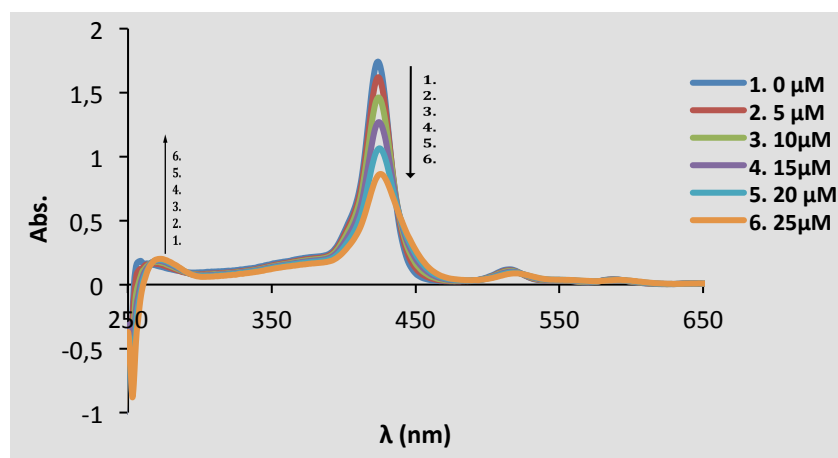


FIGURA 51. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA TMPyP (32) [10 μ M] EM DMSO NA PRESENÇA DE CT ADN. A SETA REFLETE AS ALTERAÇÕES DA ABSORVÂNCIA COM O AUMENTO DA [CT ADN].

Neste estudo de intercalação da **TMPyP (32)** utilizando o DMSO, observa-se tal como no estudo em DMF, que com o aumento da [CT ADN] não se observa qualquer desvio batocrómico da banda Soret, verificando-se porém um hipocromismo desta banda de 51,0%. Assim, perante este resultado que se assemelha ao obtido anteriormente, considerou-se que a **TMPyP (32)** em DMSO apresenta igualmente capacidade para se intercalar entre os pares de base do ADN. Posto isto, procedeu-se então ao estudo de intercalação do ADN por parte dos compostos precursores das díades assim como para as díades complexadas com Ni(II) em DMSO, sendo os resultados obtidos nesta nova abordagem apresentados em seguida (**FIGURA 52 E 53**).

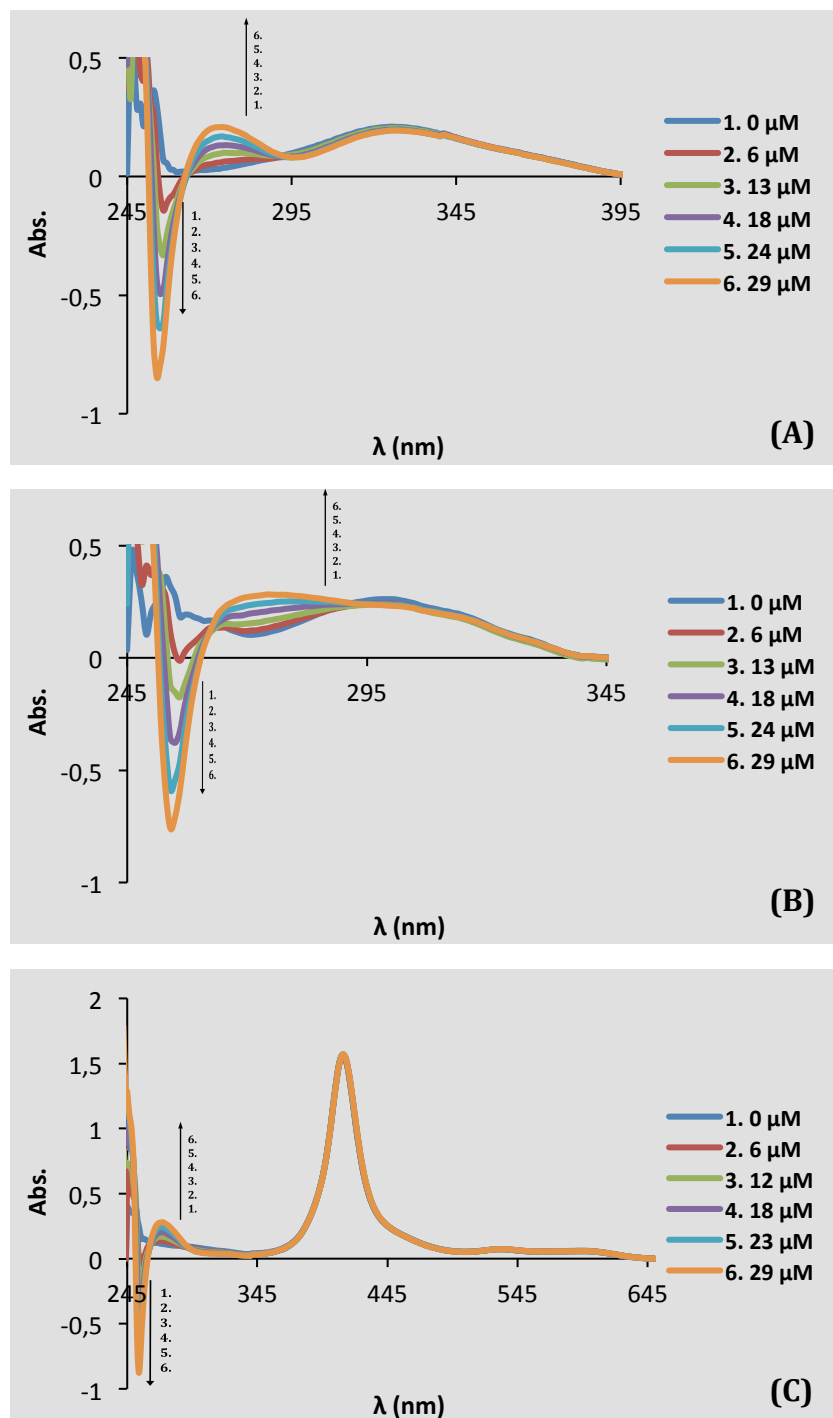


FIGURA 52. TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DA (A) 4-BROMO-2'-HIDROXI-CALCONA (7), (B) 4'-BROMOFLAVONA (8) E (C) Ni(II)-NH₂TPP (15) EM DMSO NA PRESENÇA DE CT ADN. AS SETAS REFLETEM O AUMENTO DA [CT ADN].

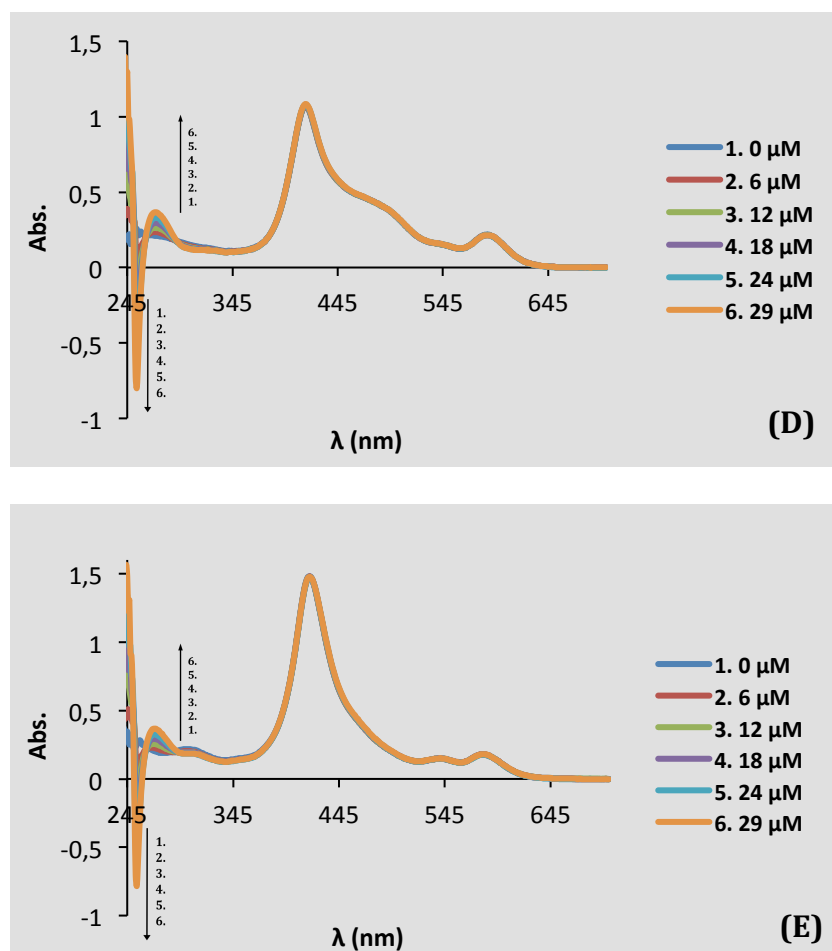


FIGURA 53. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA (D) DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) E DA (E) DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23) EM DMSO NA PRESENÇA DE CT ADN. AS SETAS REFLETEM O AUMENTO DA [CT ADN].

Pelos resultados obtidos neste novo estudo em DMSO, verifica-se novamente que com o aumento da [CT ADN] não se observa praticamente nenhuma alteração no espectro de UV-Vis, pelo que se pode igualmente concluir como no ensaio em DMF que os compostos em estudo não apresentam capacidade para intercalar o ADN entre os seus pares de base, não se podendo porém excluir a hipótese de destes se intercalarem nos *grooves* do ADN sendo necessário a realização de novos estudos que confirmem realmente esta interação.

| CAPÍTULO 4 | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

4.2. SÍNTESE DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

4.2.1. SÍNTESE DE FLAVONOIDES

4.2.2. SÍNTESE DE PORFIRINAS *MESO*-TETRASSUBSTITUÍDAS

4.2.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE

4.2.3.1 SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO*

4.2.3.2. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA

4.2.3. SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE DESCOMPLEXADAS

4.2.3.1 SÍNTESE DE DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO *MESO* DESCOMPLEXADAS

4.2.3.2. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADAS

4.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

4.3.1. AVALIAÇÃO DA EMISSÃO POR FLUORESCÊNCIA

4.3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÉNIO SINGULETO

4.3.3. AVALIAÇÃO DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA COMPLEXADAS COMO AGENTES INTERCALANTE DE ADN

4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Os solventes utilizados nas reações eram analiticamente puros. Os solventes comerciais utilizados nos processos de purificação foram previamente destilados e no caso do diclorometano, clorofórmio, éter de petróleo e tolueno, foram passados por alumina neutra (Merck). Os reagentes comerciais foram usados sem qualquer purificação prévia.

O THF foi seco por aquecimento a refluxo com sódio metálico e utilizando a benzofenona como indicador e seguidamente destilado por destilação simples.

A evolução das reações foi seguida por cromatografia em camada fina (TLC), usando folhas plastificadas, revestidas de uma camada de sílica gel 60 ou 60 F₂₅₄ da Merck e com uma espessura de 0,25 mm.

As purificações em cromatografia preparativa de camada fina foram realizadas utilizando placas de vidro (20x20 cm), previamente revestidas de sílica gel (Merck), de granulometria 0,063-0,2 mm e com uma espessura de 0,5 mm. Quando utilizadas placas revestidas com sílica com indicador estas foram observadas sob luz ultravioleta, a λ 254 e/ou 366 nm. As purificações por cromatografia de coluna foram realizadas utilizando sílica gel (Merck) com uma granulometria de 0,063-0,2mm.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registados em espectrómetros *Brucker Avance* 300 ou 500 a uma frequência de 300,13 e 500,13 MHz para ^1H e de 75,47 e 125,77 MHz para ^{13}C . Para a aquisição dos espectros foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Na caracterização dos compostos os desvios químicos (δ) são apresentados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Os espectros de massa em MALDI foram obtidos num espectrómetro de MALDI-TOF-TOF 4700 Applied Biosystems Proteomics Analyser 66, não tendo sido utilizada qualquer matriz e a partir de soluções em clorofórmio. Os espectros de massa em eletrospray (ESI) de alta resolução foram realizados na Universidade de Vigo num espectrómetro APEX-Qe, utilizando clorofórmio como solvente.

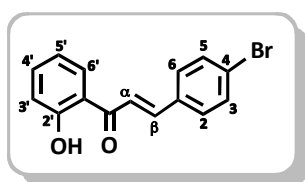
Os espectros de UV-Vis foram efetuados num espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu, em células de quartzo com um percurso ótico de 1 cm.

Os espectros de fluorescência foram obtidos num fluorímetro Fluoromax 3 Horiba Jobin ivon, utilizando células de quartzo de fluorescência com um percurso ótico de 1 cm.

4.2. SÍNTESE DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

4.2.1. SÍNTESE DE FLAVONOIDES

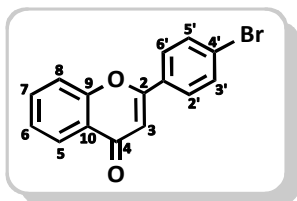
4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7) - A uma solução de 2'-hidroxiacetofenona (5,66 g, 41,5 mmol) em THF seco (100 mL), sob agitação magnética e em banho de gelo, foi adicionado NaH (2,77 g, 116 mmol). Em seguida, após a remoção do banho gelo, a mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente sendo adicionado 4-bromobenzaldeído (9,23 g, 49,9 mmol). Após um período de 4 horas a reação foi dada por terminada, sendo vertida sob gelo e água e o pH ajustado a 1 pela adição de uma solução diluída de ácido clorídrico. O precipitado formado foi filtrado, sendo em seguida dissolvido em clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água destilada, extraída com clorofórmio, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. O resíduo obtido foi por fim cristalizado em etanol, tendo-se obtido a **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** com um rendimento de 23% (2,94 g).



↷ **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 324 (4,7); UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 321 (4,0); ESI ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$), $[\text{M}+\text{H}]$: 303; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 12,75 (sl, 1H, OH), 7,91 (dd, $J = 8,1$; 1,6 Hz; 1H, H-6'), 7,86 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H, H- β), 7,65 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H, H- α), 7,58 (AB, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2,6), 7,53 (AB, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3,5), 7,55-7,49 (m, 1H, H-4'), 7,04 (dd, $J = 8,4$; 1,1 Hz, 1H, H-3'), 6,96 (ddd, $J = 8,1$; 7,7; 1,1 Hz, 1H, H-5').

4'-BROMOFLAVONA (8) - A uma solução de **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** (602 mg, 1,99 mmol) em DMSO (10 mL) adicionou-se uma quantidade catalítica de iodo. A mistura foi deixada sob agitação magnética, num banho de areia e em refluxo (180-190 °C) durante aproximadamente 30 minutos. Terminada a reação, esta foi arrefecida até à temperatura ambiente, vertida sobre uma solução saturada de tiosulfato de sódio e gelo e deixada a precipitar durante aproximadamente 1 hora. O precipitado formado foi

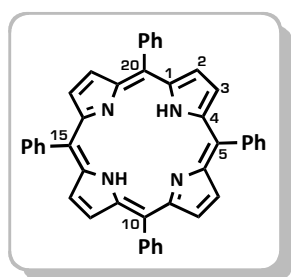
removido por filtração e posteriormente dissolvido em clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. Por fim, o resíduo obtido foi cristalizado em etanol tendo-se obtido a **4'-BROMOFLAVONA (8)** com um rendimento de 73% (473 mg).



⇒ **4'-BROMOFLAVONA (8)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 297 (4,5); UV-Vis, (DMSO) $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 300 (4,4); ESI ($\text{C}_{15}\text{H}_9\text{BrO}_2$), $[\text{M}+\text{H}]^+$: 301; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,23 (ddd, $J = 8,0; 1,73; 0,5$ Hz, 1H, H-5), 7,80 (AB, $J = 8,9$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,72 (ddd, $J = 8,5; 7,0; 1,7$ Hz, 1H, H-7), 7,67 (AB, $J = 8,9$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,57 (ddd, $J = 8,5; 1,1; 0,5$ Hz, 1H, H-8), 7,44 (ddd, $J = 8,0; 7,0; 1,1$ Hz, 1H, H-6), 6,81 (s, 1H, H-3).

4.2.2. SÍNTESE DE PORFIRINAS MESO-TETRASSUBSTITUÍDAS

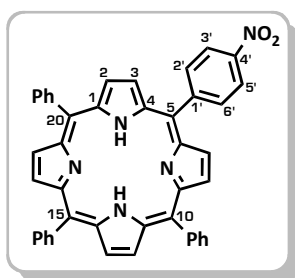
5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINA - TPP (9) - A uma mistura de ácido acético glacial (150 mL) e nitrobenzeno (75 mL) em refluxo, foi adicionado benzaldeído (5,9 mL, 57,7 mmol). Em seguida, adicionou-se pirrol gota a gota (4 mL, 57,7 mmol) sendo a mistura deixada sob refluxo durante 1 hora. Findo este período, adicionou-se metanol à mistura reacional sendo a **TPP (9)** recuperada diretamente do meio reacional por cristalização, com um rendimento de 30% (2,58 g).



⇒ **TPP (9)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 416 (100), 513 (4,4), 548 (2,0), 590 (1,3), 647 (1,2); MALDI ($\text{C}_{44}\text{H}_{30}\text{N}_4$), $[\text{M}^+]$: 614,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,84 (s, 8H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,23-8,20 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,79-7,72 (m, 12H, 5,10,15,20-H-*m,p*-Ph), -2,78 (sl, 2H, NH).

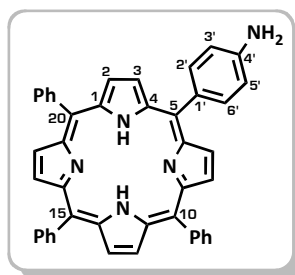
5-(4-NITROFENIL)-10,15,20-TRIFENILPORFIRINA - NO_2 -TPP (10) - A uma solução de **TPP (9)** (100 mg, 0,163 mmol) em ácido trifluoroacético (10 mL) foi adicionado nitrito de sódio (20 mg, 0,290 mmol). A reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente sendo dada por terminada ao fim de 2,5 minutos de reação. Posteriormente, esta foi vertida sobre água, procedendo-se em seguida à sua neutralização pela adição de uma solução

saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Por fim, a fase orgânica foi extraída com clorofórmio, lavada com água destilada, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. O resíduo obtido foi em seguida retomado em clorofórmio e purificado utilizando uma coluna de sílica gel, tendo sido usado como eluente uma mistura de éter de petróleo e tolueno (2:1). Após purificação, a **NO₂-TPP (10)** foi cristalizada em metanol, sendo obtida com um rendimento de 81% (86,7 mg).



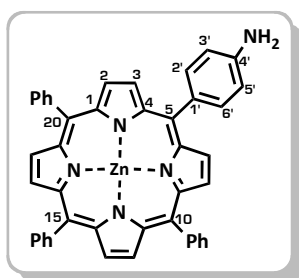
➤ **NO₂-TPP (10)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 418 (100), 514 (5,1), 549 (2,4), 590 (1,5), 645 (1,2); MALDI ($\text{C}_{44}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_2$), $[\text{M}^+]$: 659,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,89 (AB, d, $J = 4,9$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,88-8,86 (m, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,74 (AB, d, $J = 4,9$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,64 (AB, d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2',6'), 8,41 (AB, d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3',5'), 8,23-8,20 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 7,80-7,74 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), -2,73 (sl, 2H, NH).

5-(4-AMINOFENIL)-10,15,20-TRIFENILPORFIRINA - NH₂-TPP (11) - Dissolveram-se 86,7 mg de **NO₂-TPP (10)** (0,131 mmol) em ácido clorídrico concentrado (10 mL), sendo em seguida sob agitação magnética cuidadosamente adicionado cloreto de estanho di-hidratado (220 mg, 0,975 mmol). A reação foi deixada à temperatura de 65 °C, sob uma atmosfera de nitrogénio, sendo dada por terminada ao fim de 1 hora. A mistura reacional foi vertida sobre água, neutralizada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi em seguida lavada com água destilada, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. O resíduo obtido foi retomado em clorofórmio e purificado recorrendo a uma coluna de sílica gel, tendo-se utilizado como eluente uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:2). Por fim, por cristalização em metanol a **NH₂-TPP (11)** foi obtida com um rendimento de 93% (76,9 mg).



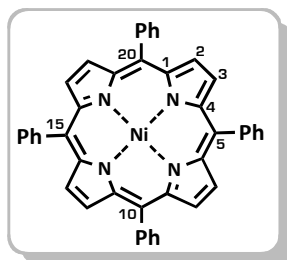
➤ **NH₂-TPP (11)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 418 (100), 517 (5,7), 557 (4,0), 592 (2,1), 650 (2,1); MALDI ($\text{C}_{44}\text{H}_{31}\text{N}_5$), $[\text{M}+\text{H}]$: 630,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,95-8,83 (m, 8H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,23-8,20 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 8,00 (AB, $J = 8,3$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,79-7,73 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), 7,07 (AB, $J = 8,3$ Hz, 2H, H-3',5'), -2,76 (sl, 2H, NH).

5-(4-AMINOFENIL)-10,15,20-TRIFENILPORFIRINATOZINCO(II) - ZN(II)-NH₂-TPP (12) - A uma solução de **NH₂-TPP (11)** (35,6 mg, 0,0565 mmol) em clorofórmio (14 mL) e metanol (4,5 mL), foi adicionado acetato de zinco di-hidratado (18,6 mg, 0,0874 mmol). A mistura manteve-se sob agitação, a uma temperatura de 65 °C, tendo sido dada por terminada ao fim de 30 minutos. Findo este período, a mistura reacional foi lavada com água destilada, extraída com clorofórmio, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. O resíduo obtido foi retomado em clorofórmio e cristalizado em metanol, tendo-se obtido a **ZN(II)-NH₂-TPP (12)** com um rendimento de 76% (29,7 mg).



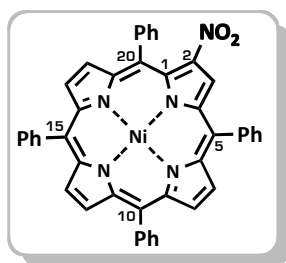
➤ **ZN(II)-NH₂-TPP (12)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 427 (100), 561 (4,8), 603 (3,2); MALDI ($\text{C}_{44}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{Zn}$), $[\text{M}^+]$: 691,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 9,03 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirr}}^{\text{r}}\text{ólic}$ os), 8,93 (m, 6H, H- $\beta_{\text{pirr}}^{\text{r}}\text{ólic}$ os), 8,23-8,21 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 7,97 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,76-7,74 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), 6,97 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-3',5').

5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINATONÍQUEL(II) - Ni(II)-TPP (13) - A uma solução de **TPP (9)** (770 mg, 1,25 mmol) em DMF (15 mL), adicionou-se acetato de níquel tetra-hidratado (1,01 g, 4,07 mmol). A mistura foi mantida sob agitação em refluxo (150 °C), durante 23 horas. Terminada a reação foi adicionado gelo ao meio reacional, dando-se assim a precipitação do material porfirínico, que foi posteriormente filtrado. O precipitado obtido foi retomado em clorofórmio e purificado em uma coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura de éter de petróleo e tolueno (1:1), tendo-se obtido a **Ni(II)-TPP (13)** com um rendimento de 94% (789 mg).



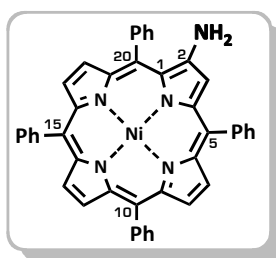
➤ **Ni(II)-TPP (13)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 416 (100), 512 (4,4), 587 (1,0); MALDI ($\text{C}_{44}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{Ni}$), $[\text{M}^+]$: 670,1; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,75-8,66 (m, 8H, H- $\beta_{\text{pirr}}^{\text{r}}\text{ólic}$ os), 8,03-7,95 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,71-7,61 (m, 12H, 5,10,15,20-H-*m,p*-Ph).

2-NITRO-5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINATONÍQUEL(II) - Ni(II)-NO₂-TPP (14) - A uma solução de **Ni(II)-TPP (13)** (200 mg, 0,298 mmol) em clorofórmio (126 mL) foi adicionado nitrato de lítio (0,376 g, 0,538 mmol) dissolvido numa mistura de ácido acético (21 mL) e anidrido acético (20 mL). A mistura reacional foi deixada a 45 °C sob agitação magnética, durante 4 horas. Findo este período, a mistura reacional foi neutralizada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, lavada com água destilada, extraída com clorofórmio e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após a remoção do solvente, o resíduo foi retomado em clorofórmio e purificado recorrendo a uma coluna de sílica gel, tendo-se usado como eluente uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:1). Após purificação, a **Ni(II)-NO₂-TPP (14)** foi obtida com um rendimento de 90% (191 mg).



☞ **Ni(II)-NO₂-TPP (14)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{máx.}}$ (%) nm: 312 (11,2), 428 (100), 539 (8,4), 581 (5,9); MALDI (C₄₄H₂₇N₅NiO₂), [M⁺]: 715,1; RMN DE ¹H (300,13 MHz, CDCl₃), δ ppm: 8,98 (s, 1H, H-3 $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,72-8,62 (m, 6H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,01-7,96 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,73-7,60 (m, 12H, 5,10,15,20-H-*m,p*-Ph).

2-AMINO-5,10,15,20-TETRAFENILPORFIRINATONÍQUEL(II) - Ni(II)-NH₂-TPP (15) - A uma solução de **Ni(II)-NO₂-TPP (14)** (126 mg, 0,175 mmol) em clorofórmio (14,8 mL) adicionou-se estanho em pó (2,08 g, 17,5 mmol) e ácido clorídrico concentrado (7,3 mL). Fechado o balão, a reação foi mantida sob agitação magnética intensa, à temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Após este período, a mistura reacional foi filtrada através de uma pequena coluna de Celite®-545, sendo usado clorofórmio para remover o material porfirínico. Posteriormente, procedeu-se à neutralização da mistura reacional com uma solução saturada de hidróxido de sódio, sendo a fase orgânica em seguida extraída com clorofórmio, lavada com água destilada e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente, o resíduo obtido foi retomado em clorofórmio e purificado recorrendo a uma coluna de sílica gel, utilizando tolueno como eluente. Por fim, a **Ni(II)-NH₂-TPP (15)** foi cristalizada em éter de petróleo tendo sido obtida com um rendimento de 73% (87,9 mg).

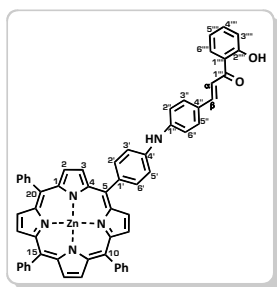


➤ **Ni(II)-NH₂-TPP (15)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 410 (5,4), 531 (4,1), 594 (4,0); UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 411 (5,0), 532 (2,9); MALDI ($\text{C}_{44}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{Ni}$), $[\text{M}^+]$: 685,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,69-8,60 (m, 5H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,54 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$) 8,00-7,92 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,73-7,60 (m, 12H, 5,10,15,20-H-*m,p*-Ph).

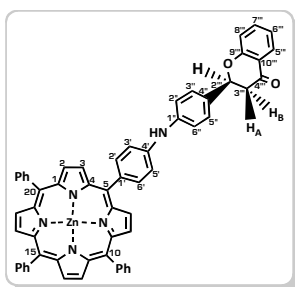
4.2.3. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE

4.2.3.1 SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO MESO

5- $\{ [4-((E)-3-(2\text{-HIDROXIFENIL})-3\text{-OXO-PROP-1-EN-1-IL})\text{AMINOFENIL}]-10,15,20\text{-TRIFENILPORFIRINATOZINCO(II)}$ - DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16) - A uma solução de **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** (13,1 mg, 19 μmol) em tolueno em fio de sódio (1,6 mL), adicionou-se **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** (11,6 mg, 38 μmol , 2,0 equiv.), acetato de paládio (1,4 mg, 5,5 μmol , 0,32 equiv.), *rac*-BINAP (3,1 mg, 5,0 μmol , 0,26 equiv.) e KO^tBu (4,8 mg, 43 μmol , 2,26 equiv.). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética, a uma temperatura de 95-110 °C e sob uma atmosfera de nitrogênio, durante aproximadamente 30 horas. Após este período, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e filtrada através de uma pequena coluna de Celite®-545, sendo a componente orgânica removida utilizando clorofórmio. Em seguida, esta foi lavada com água destilada, extraída e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em clorofórmio sendo purificado por cromatografia preparativa em camada fina, tendo-se utilizado como eluente clorofórmio. Do processo de purificação, foram isolados três compostos, tendo sido identificados a partir do maior R_f como sendo, a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** de cor vermelha (4,6 mg, η =31% baseado no consumo da porfirina de partida), a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17)** de cor vermelha clara (0,7 mg, η =5%, baseado no consumo da porfirina de partida) e a **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** não consumida de cor rosa (2 mg, η =15%).



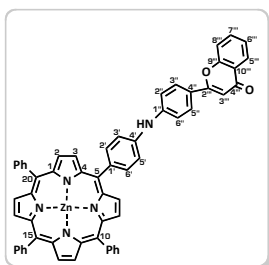
➤ **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16) - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm:** 314 (4,7), 427 (5,5), 560 (4,4), 600 (4,2); **MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_2\text{Zn}$), $[\text{M}^+]$:** 913,2; **HRMS - ESI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_2\text{Zn}$), $[\text{M}^+]$:** esperado: 913,2395 - obtido: 913,2390; **RMN DE ^1H (500,13 MHz, CDCl_3), δ ppm:** 12,99 (sl, 1H, OH), 9,03 (d, $J = 4,6$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,97 (d, $J = 4,6$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,95 (sl, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,24-8,21 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 8,18 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,93 (dd, $J = 8,1$; 1,6 Hz, 1H, H-6'''), 7,92 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, H- β), 7,79-7,73 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), 7,68 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-3'',5''), 7,54 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, H- α), 7,53 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,47 (ddd, $J = 8,4$; 7,1; 1,6 Hz, 1H, H-4'''), 7,32 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2'',6''), 6,99 (dd, $J = 8,4$; 1,1 Hz, 1H, H-3'''), 6,93 (ddd, $J = 8,1$; 7,1; 1,1 Hz, 1H, H-5'''), 6,39 (sl, 1H, NH); **RMN DE ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3), δ ppm:** 193,6 (C-1'''), 163,5 (C-2'''), 150,31, 150,26, 150,19, 150,17 (C- $\alpha_{\text{pirrólicos}}$), 146,2 (C-1''), 145,6 (C- β), 142,79 (10,20-C₁-Ph), 142,77 (15-C₁-Ph), 140,6 (C-4'), 137,2 (C-1'), 136,0 (C-4'''), 135,5 (C-2',6'), 134,4 (10,15,20-C-*o*-Ph), 132,0, 131,9 (C- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 130,8 (C-3'',5''), 129,4 (C-6'''), 127,5 (10,15,20-C-*p*-Ph), 126,7 (C-4''), 126,6 (10,15,20-C-*m*-Ph), 121,14, 121,13, 120,6 (C-*meso*), 120,2 (C-1'''), 118,7 (C-5'''), 118,5 (C-3'''), 117,5 (C-3',5'), 116,5 (C- α), 116,4 (C-2'',6'').



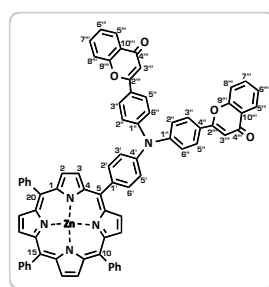
➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (17) - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm:** 310 (4,5), 427 (5,4), 560 (4,2), 603 (4,1); **MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_2\text{Zn}$), $[\text{M}^+]$:** 913,2; **RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm:** 9,06 (AB, $J = 4,7$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,97 (AB, $J = 4,7$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,94 (s, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,26-8,19 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 8,14 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,95 (dd, $J = 8,1$; 1,8 Hz, H-5'''), 7,80-7,71 (m, 10H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph e H-7'''), 7,54-7,48 (m, 8H, H-8''', H-6''', H-3'',5'', H-2'',6'' e H-3',5'), 6,10 (sl, 1H, NH), 5,50 (dd, $J = 13,2$; 2,8 Hz, 2H, H-2'''), 3,20 (dd, $J = 16,9$; 13,2 Hz, H-3B'''), 2,94 (dd, $J = 16,9$; 2,8 Hz, H-3A''').

5- $\{$ [4-(4-oxo-4H-cromen-2-yl)aminofenil]-10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) - Díade Porfirina-Flavona (18) - A uma solução de **Zn(II)-NH₂-TPP (12)** (13,0 mg, 19 μmol) em tolueno em fio de sódio (1,6 mL), adicionou-se **4'-bromoflavona (8)** (12,4 mg, 41 μmol , 2,20 equiv.), acetato de paládio (1,4 mg, 6,2 μmol , 0,33 equiv.), *rac*-BINAP (3,2 mg, 5,1 μmol , 0,27 equiv.) e KO^tBu (5,4 mg, 48 μmol , 2,57 equiv.). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética, a uma temperatura de 95-110 °C e sob uma atmosfera de nitrogênio, durante 23 horas. Findo este período, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e filtrada através de uma pequena coluna de Celite®-545, sendo a componente orgânica removida utilizando clorofórmio. A fase orgânica foi então lavada com água destilada, extraída com clorofórmio e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após

a evaporação do solvente, o resíduo foi retomado em clorofórmio e purificado por cromatografia preparativa em camada fina. Numa primeira purificação, foi utilizado o clorofórmio como eluente tendo-se isolado o composto com maior R_f , o qual se tratava da **ZN(II)-NH₂-TPP (12)**, de cor rosa, que ficou por reagir (2,1 mg, η =16%). Numa segunda purificação utilizando como eluente uma mistura de clorofórmio e acetato de etilo a 2,5%, foi possível isolar mais dois compostos, sendo estes identificados, do maior para o menor R_f , como a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** de cor castanha escura (9,3 mg, η =65%, rendimento baseado no consumo da porfirina de partida) e a **TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (20)** de cor castanha clara (0,9 mg, η =5% rendimento baseado no consumo da porfirina de partida).



➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 302 (4,5), 428 (5,6), 560 (4,3), 600 (4,2); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_2\text{Zn}$), $[\text{M}^+]$: 911,2; HRMS - ESI ($\text{C}_{59}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_2\text{Zn}$), $[\text{M}^+]$: esperado: 911,2239 - obtido: 911,2233; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 9,05 (AB, d, J = 4,7 Hz, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,96 (AB, d, J = 4,7 Hz, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,95 (sl, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$) 8,25-8,21 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 8,20 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-2',6'), 8,15 (dd, J = 7,9; 1,5 Hz, 1H, H-5'''), 7,96 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3'',5''), 7,79-7,75 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), 7,72-7,66 (m, 1H, H-7'''), 7,61-7,56 (m, 1H, H-8'''), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3',5'), 7,47 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-2'',6''), 7,43-7,38 (m, 1H, H-6'''), 6,70 (s, 1H, H-3'''), 6,47 (sl, 1H, NH).

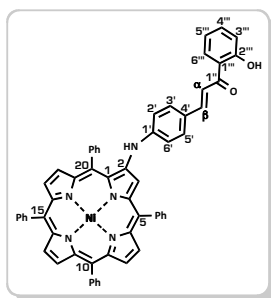


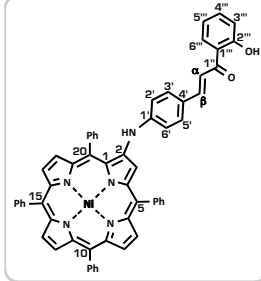
➤ **TRÍADE PORFIRINA-2-FLAVONA (19)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 306 (11), 427 (100), 560 (4), 600 (3); MALDI ($\text{C}_{74}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_4\text{Zn}$), $[\text{M}^+]$: 1131,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 9,07 (AB, J = 4,7 Hz, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 9,02 (AB, J = 4,7 Hz, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólicos}}$), 8,27-8,17 (m, 10H, 10,15,20-H-*o*-Ph, H-2',6' e 2x(H-5''')), 8,01 (d, J = 8,9 Hz, 4H, 2x(H-3'',5'')), 7,80-7,75 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), 7,75-7,69 (m, 2H, 2x(H-7''')), 7,62-7,58 (m, 4H, H-3',5' e 2x(H-8''')), 7,57 (d, J = 8,9 Hz, 4H, 2x(H-2'',6'')), 7,46-7,41 (m, 2H, 2x(H-6''')), 6,77 (s, 2H, 2x(H-3''')).

4.2.3.2. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA

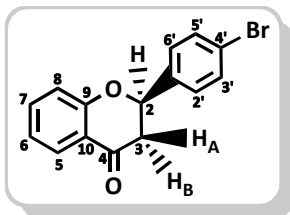
2- $\{ [4-((E)-3-(2\text{-HIDROXIFENIL})-3\text{-OXO-PROP-1-EN-1-IL})\text{FENIL}] \text{AMINO} \}$ -5,10,15,20-TRIFENILPORFIRINATONÍQUEL(II) - **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** - A uma solução de **Ni(II)-NH₂-TPP (15)** (13,6 mg, 20 μmol) em tolueno em fio de sódio (1,6 mL), adicionou-se **4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)** (12,2 mg, 40 μmol , 2 equiv.), acetato de paládio (1,3 mg,

5,7 μmol , 0,29 equiv.), *rac*-BINAP (3,4 mg, 5,5 μmol , 0,27 equiv.) e KO^tBu (5,3 mg, 47 μmol , 2,38 equiv.). Esta reação foi realizada nas mesmas condições descritas para a preparação da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)**, tendo no entanto a reação sido terminada ao fim de aproximadamente 8 horas. O término desta reação foi de igual modo realizado ao da reação anterior. Para proceder à purificação da mistura reacional recorreu-se à cromatografia preparativa em camada fina, utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:1). Do processo de purificação foi possível isolar três compostos principais, os quais foram identificados, do maior para o menor R_f , como sendo, a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** pretendida de cor castanha escura (9,1 mg, η =51%), a **4'-BROMOFLAVANONA (21)** de cor bege (0,9 mg, η =15%) e a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22)** de cor castanha (2,8 mg, η =16%).

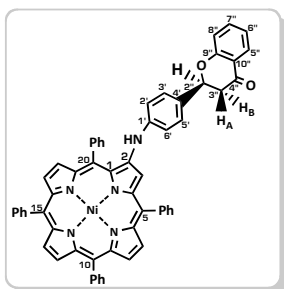




➔ **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20) - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm:** 277 (4,3), 414 (5,1), 538 (4,2), 585 (4,4); **UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm:** 270 (4,1), 414 (5,1), 542 (4,9), 587 (4,4); **MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{NiO}_2$), $[\text{M}^+]$:** 907,2; **HRMS - ESI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{NiO}_2$), $[\text{M}^+]$:** esperado: 907,2457 - obtido: 907,2452; **RMN DE ^1H (500,13 MHz, CDCl_3), δ ppm:** 12,89 (s, 1H, OH), 8,6812 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,6809 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,66 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,64 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,61 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,54 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,37 (s, 1H, H-3 $\beta_{\text{pirrónico}}$), 7,99-7,95 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,90 (dd, $J = 8,1$; 1,7 Hz, 1H, H-6'''), 7,87 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H, H- β), 7,81-7,79 (m, 1H, 20-H-*p*-Ph), 7,75-7,72 (m, 2H, 20-H-*m*-Ph), 7,67-7,64 (m, 9H, 5,10,15-H-*m,p*-Ph), 7,53 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,49 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H, H- α), 7,48-7,44 (m, 1H, H-4'''), 7,01 (dd, $J = 8,4$; 1,1 Hz, 1H, H-3'''), 6,91 (ddd, $J = 8,1$; 7,1; 1,1 Hz, 1H, H-5'''), 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2',6'), 6,55 (s, 1H, NH); **RMN DE ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3), δ ppm:** 193,7 (C-1'), 163,7 (C-2'''), 145,4 (C- β), 145,2 (C-1'), 144,1, 143,30, 143,26, 143,2, 142,7, 142,6, 142,1, 141,7 (C- $\alpha_{\text{pirrónicos}}$), 141,2, 140,88, 140,85 (5,10,15-C₁-Ph), 139,9 (20-C₁-Ph), 135,9 (C-4'''), 133,7, 133,64, 133,56 (5,10,15,20-C-*o*-Ph), 132,9, 132,6, 132,1, 132,0, 131,72, 131,70, 131,0 (C- $\beta_{\text{pirrónicos}}$), 130,6 (C-3',5'), 129,5 (C-6'''), 128,9 (20-C-*p*-Ph), 128,5 (20-C-*m*-Ph), 127,86, 127,83, 126,79 (5,10,15-C-*p*-Ph), 127,1, 126,93, 126,91 (5,10,15-C-*m*-Ph), 127,0 (C-4'), 120,5, 118,9, 116,7 e 155,8 (C-*meso*), 120,2 (C-1'''), 118,7 (C-5'''), 118,6 (C-3'''), 116,7 (C- α), 115,9 (C-4'), 115,7 (C-2',6'), 114,5 (C-3 $\beta_{\text{pirrónico}}$).

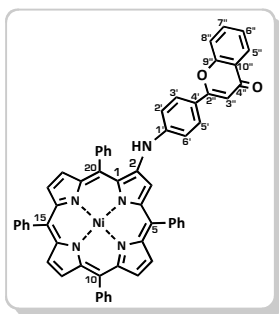


➤ **4'-BROMOFLAVANONA (21)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (% nm): 319 (100), 418 (4,1); RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 7,93 (dd, $J = 7,9$; 1,9 Hz, 1H, H-5), 7,57 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,55-7,50 (m, 1H, H-7), 7,40 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,10-7,04 (m, 2H, H-6 e H-8), 5,46 (dd, $J = 12,8$; 3,1 Hz, 1H, H-2), 3,04 (dd, $J = 16,8$; 12,8 Hz, 1H, H-3B), 2,89 (dd, $J = 16,8$; 3,1 Hz, 1H, H-3A).



➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (22)** - UV-Vis (DMF) $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 275 (5,4), 415 (6,2), 539 (5,1), 582 (5,1); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{NiO}_2$), $[\text{M}^+]$: 907,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,693 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,688 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,66 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,65 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,61 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,57 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,30 (s, 1H, H-3 $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,00-7,93 (m, 9H, 5,10,15,20-H-o-Ph e H-5''), 7,82-7,77 (m, 3H, 20-H-m,p-Ph), 7,71-7,63 (m, 9H, 5,10,15-H-m,p-Ph), 7,52 (ddd, $J = 8,3$; 7,2; 1,8 Hz, 1H, H-7''), 7,36 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,09-7,04 (m, 2H, H-6'' e H-8''), 6,95 (dd, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-2',6'), 6,44 (sl, 1H, NH), 5,42 (dd, $J = 13,4$; 2,8 Hz, 1H, H-2), 3,15 (dd, $J = 16,9$; 13,4 Hz, 1H, H-3B''), 2,88 (dd, $J = 16,9$; 2,8 Hz, 1H, H-3A'').

2-[4-(4-oxo-4H-cromen-il)fenil]amino-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato níquel(II) - **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** - A uma solução de **Ni(II)-NH₂-TPP (15)** (12,5 mg, 18 μmol) em tolueno em fio de sódio (1,5 mL), adicionou-se **4'-BROMOFLAVONA (8)** (11,5 mg, 38 μmol , 2,1 equiv.), acetato de paládio (1,2 mg, 5,3 μmol , 0,29 equiv.), *rac*-BINAP (2,9 mg, 4,7 μmol , 0,26 equiv.) e KO^tBu (4,6 mg, 41 μmol , 2,25 equiv.). As condições reacionais utilizadas nesta reação foram as mesmas que as descritas anteriormente, tendo neste caso a reação sido dada como terminada após 65 horas. Para proceder à purificação da mistura reacional recorreu-se à cromatografia preparativa em camada fina, tendo-se numa primeira purificação utilizado como eluente o clorofórmio, isolando-se o composto com o maior R_f , o qual foi identificado como sendo a **Ni(II)-NH₂-TPP (15)**, de cor rosa, não consumida (0,5 mg, $\eta=6,4\%$). Numa segunda purificação utilizando uma mistura de clorofórmio e acetato de etilo a 2,5%, foi isolado um composto principal tratando-se da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** pretendida de cor castanha escura (14 mg, $\eta=91\%$ baseado no consumo da porfirina de partida).



➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 300 (4,4), 417 (5,2), 541 (4,2), 580 (4,3); UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 302 (4,4), 417 (5,2), 537 (4,2), 581 (4,3); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{NiO}_2$): 905,2 [M^+]; HRMS - ESI ($\text{C}_{59}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{NiO}_2$), [M^+]: esperado: 905,2301 - obtido: 905,2295; RMN DE ^1H (500,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,7101 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,7100 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,69 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,67 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,64 (AB, $J = 5,0$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,60 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,42 (s, 1H, H- $3\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,24 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-5''), 8,01-7,97 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,87-7,830 (m, 1H, 20-H-*p*-Ph), 7,834 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,80-7,76 (m, 2H, 20-H-*m*-Ph), 7,71-7,65 (m, 10H, 5,10,15-H-*m,p*-Ph e H-7''), 7,55 (dd, $J = 8,6; 0,9$ Hz, 1H, H-8''), 7,42 (ddd, $J = 7,9; 7,1; 0,9$ Hz, 1H, H-6''), 6,95 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2',6'), 6,74 (s, 1H, H-3''), 6,57 (sl, 1H, NH); RMN DE ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3), δ ppm: 178,3 (C-4''), 165,2 (C-2''), 156,2 (C-9''), 145,4 (C-1'), 143,8, 143,1, 142,9, 142,5, 142,3, 141,8, 141,5, 140,0 (C- $\alpha_{\text{pirrónicos}}$), 140,59, 140,56 (5,10,15-C₁-Ph), 139,6 (20-C₁-Ph), 133,7-133,5 (5,10,15,20-C-*o*-Ph), 133,1 (C-7''), 133,0, 132,6, 132,2, 132,18, 132,09, 131,0 (C- $\beta_{\text{pirrónicos}}$), 129,0 (20-C-*p*-Ph), 128,5 (20-C-*m*-Ph), 127,9 (C-3',5'), 127,1 (5,10,15-C-*p*-Ph), 126,9 (5,10,15-C-*p*-Ph), 125,7 (C-5''), 125,0 (C-6''), 124,0 (C-10''), 122,9 (C-4'), 120,1, 118,8, 116,6, 115,7 (C-*meso*), 117,9 (C-8''), 115,2 (C-2',6'), 114,4 (C- $3\beta_{\text{pirrónico}}$), 105,5 (C-3'').

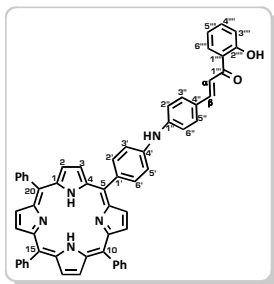
4.2.4. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE DESCOMPLEXADAS

4.2.4.1. SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO MESO DESCOMPLEXADAS

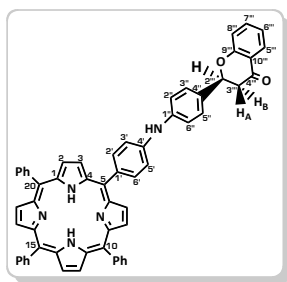
5-[4-((*E*)-3-(2-HIDROXIFENIL)-3-OXO-PROP-1-EN-1-IL)]AMINOFENIL-10,15,20-

TRIFENILPORFIRINA - DÍADE PORFIRINA-CALCONA (24) - A uma solução da DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16) em posição *meso* (2,5 mg, 2,5 μmol) em clorofórmio (1425 μL) adicionou-se ácido trifluoracético (75 μL), sendo esta mistura deixada sob agitação magnética e a temperatura ambiente. Após controlo por TLC e por UV-Vis, a reação foi dada por concluída ao fim de aproximadamente 20 minutos. Em seguida, procedeu-se à sua neutralização com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, sendo a fase orgânica posteriormente lavada com água destilada, extraída com clorofórmio e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após a remoção do solvente no evaporador rotativo, o resíduo obtido foi purificado recorrendo-se à cromatografia preparativa em camada fina. A utilização de uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:2) permitiu isolar três compostos, sendo aquele que apresentava maior R_f identificado como sendo a DÍADE

PORFIRINA-CALCONA (24) de cor castanha escura (1,5 mg, $\eta=70\%$), o composto com R_f intermédio a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (25)** de cor castanha clara (0,2 mg, $\eta=9\%$) e com o menor R_f a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (16)** de partida (0,2 mg, $\eta=8\%$).



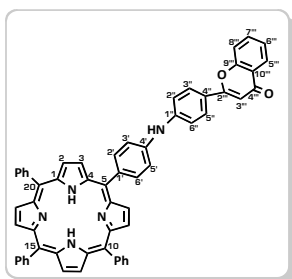
➤ **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (24)** - UV-Vis (DMF) $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 293 (4,3), 417 (5,0), 516 (4,2), 554 (4,1), 591 (4,0), 646 (3,9); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_2$), $[\text{M}^+]$: 851,3; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 13,06 (sl, 1H, OH), 8,94 (AB, $J = 4,8$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,87 (AB, $J = 4,8$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,85 (sl, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,24-8,21 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 7,56 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2',6'), 8,01-7,98 (m, 1H, H-6'''), 7,99 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, H- β), 7,80-7,72 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), 7,73 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3'',5''), 7,61 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, H- α), 7,56 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,53-7,48 (m, 1H, H-4'''), 7,37 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2'',6''), 7,04 (dd, $J = 8,4; 1,0$ Hz, 1H, H-3'''), 6,96 (ddd, $J = 8,1; 7,2; 1,0$ Hz, 1H, H-5'''), 6,43 (sl, 1H, NH), -2,75 (sl, 2H, H-21 e H-23).



➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (25)** - UV-Vis (DMF) $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 304 (5,0), 417 (5,8), 517 (4,7), 555 (4,6), 590 (4,4), 649 (4,4); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_2$), $[\text{M}^+]$: 851,3; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,96 (AB, $J = 4,8$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,86 (AB, $J = 4,8$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,84 (s, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,24-8,20 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*-Ph), 8,14 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,97 (dd, $J = 7,8; 1,6$ Hz, 1H, H-5'''), 7,81-7,72 (m, 10H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph e H-7'''), 7,53 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-3'',5''), 7,61-7,48 (m, 2H, H-6''' e H-8'''), 7,42 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,07 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-2'',6''), 6,21 (sl, 1H, NH), -2,75 (s, 2H, H-21 e H-23).

5-[4-(4-oxo-4H-cromen-1-yl)aminofenil]-10,15,20-tetrafenilporfirina - **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (26)** - A uma solução da **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (18)** (2,6 mg, 2,9 μmol) em clorofórmio (1425 μL), foi adicionado ácido trifluoracético (75 μL). A reação foi deixada à temperatura ambiente, sob agitação magnética durante 20 minutos, sendo então vertida sobre água e neutralizada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. A fase orgânica foi lavada com água destilada, extraída com clorofórmio, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. O resíduo obtido foi em seguida retomado em clorofórmio e purificado por cromatografia preparativa de camada fina, sendo utilizada uma mistura de éter de petróleo e

clorofórmio (1:2) como solvente, tendo-se conseguido obter a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (26)** descomplexada de cor castanha escura (2 mg, $\eta=82\%$).



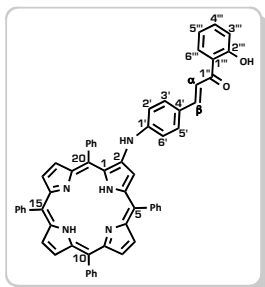
➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (26)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 300 (3,8), 418 (4,2), 515 (4,0), 555 (3,9), 593 (3,5), 648 (3,5); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_2$): 849,3 [M^+]; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,94 (AB, $J = 4,8$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,88 (AB, $J = 4,8$ Hz, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,85 (sl, 4H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,27-8,21 (m, 7H, H-5''' e 10,15,20-H-*o*-Ph), 8,19 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,98 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3'',5''), 7,80-7,73 (m, 9H, 10,15,20-H-*m,p*-Ph), 7,71-7,63 (m, 1H, H-7'''), 7,61-7,58 (m, 1H, H-8'''), 7,57 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,45-7,41 (m, 1H, H-6'''), 7,43 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2'',6''), 6,82 (m, 1H, H-3'''), 6,46 (sl, 1H, NH), -2,75 (sl, 2H, H-21 e H-23).

4.2.4.2 SÍNTESE DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA DESCOMPLEXADAS

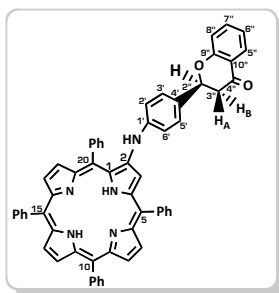
2-[4-((*E*)-3-(2-HIDROXIFENIL)-3-OXO-PROP-1-EN-1-IL)FENIL]AMINO-5,10,15,20-

TRIFENILPORFIRINA - **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (27)** - A uma solução da **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** (10 mg, 11 μmol) em clorofórmio (4,5 mL), foi adicionado ácido sulfúrico (0,5 mL). A reação foi deixada sob agitação magnética, à temperatura ambiente durante 20 minutos. Findo este período, a mistura reacional foi vertida sobre água, procedendo-se à sua neutralização com uma solução saturada de hidróxido de sódio, sendo em seguida realizado o procedimento habitual de lavagem, extração com clorofórmio e secagem sobre sulfato de sódio anidro. Após evaporação até à secura, o resíduo obtido foi retomado em clorofórmio e purificado por cromatografia preparativa de camada fina, tendo-se utilizando uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:2) como eluente. Por TLC, foram observados dois compostos como produtos desta reação, contudo a utilização indevida de placas de cromatografia com indicador levou à obtenção de quatro compostos. Os dois compostos com maior R_f foram identificados como sendo a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (27)** de cor castanha escura (0,2 mg, $\eta=2\%$) e a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (28)** de cor castanha clara (0,4 mg, $\eta=5\%$), ambas na forma descomplexada e os quais seriam os produtos esperados desta reação. Os outros dois compostos com os R_f menores foram identificados como sendo a **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (29)** de cor castanha

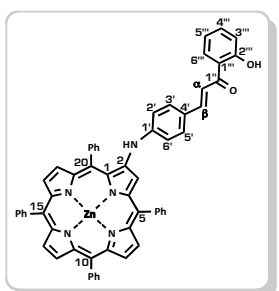
escura (3,1 mg, η =31%) e a **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (30)** de cor castanha clara (3,7 mg, η =37%), ambas complexadas com zinco e as quais foram obtidas devido à complexação das duas díades referidas anteriormente com o zinco presente no indicador das placas de cromatográficas.



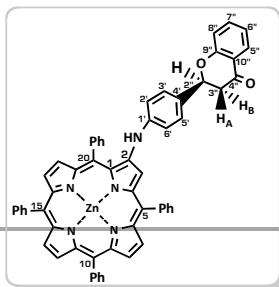
➤ **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (27)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 280 (4,6), 410 (5,3), 472 (4,8), 574 (4,3), 599 (4,3), 655 (3,5); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_2$), [M+H]: 852,3; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 13,04 (sl, 1H, OH), 8,85 (AB, J = 5,0 Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,81 (AB, J = 4,9 Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,78 (AB, J = 5,0 Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,75 (sl, 2H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,61 (AB, J = 4,9 Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,40 (s, 1H, H-3 $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,23-8,18 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,96-7,89 (m, 4H, H-6''' e 20-H-*m,p*-Ph), 7,91 (d, J = 15,2 Hz, 1H, H- β), 7,78-7,71 (m, 9H, 5,10,15-H-*m,p*-Ph), 7,61 (d, J = 7,8 Hz, 2H, H-3',5'), 7,56 (d, J = 15,2 Hz, 1H, H- α), 7,54-7,48 (m, 1H, H-4'''), 7,05-6,93 (m, 2H, H-3'' e H-5'''), 6,92 (d, J = 7,8 Hz, 2H, H-2',6'), 6,82 (sl, 1H, NH), -2,62 (sl, 2H, H-21 e H-23).



➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (28)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (Log ϵ) nm: 280 (4,3), 409 (5,2), 523 (4,1), 568 (3,9), 600 (3,8), 656 (3,5); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_2$), [M+H]: 852,3; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,91-8,78 (m, 5H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,61 (d, J = 4,8 Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,36 (s, 1H, H-3 $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,25-8,21 (m, 9H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph e H-5''), 8,00-7,97 (m, 2H, 20-H-*p*-Ph), 7,93-7,88 (m, 2H, 20-H-*m*-Ph), 7,79-7,74 (m, 9H, 5,10,15-H-*m,p*-Ph), 7,56 (ddd, J = 8,3; 7,2; 1,7 Hz, 1H, H-7''), 7,43 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-3',5'), 7,13-7,08 (m, 2H, H-6'' e H-8''), 7,08 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-2',6'), 6,70 (sl, 1H, NH), 5,47 (dd, J = 14,0; 2,7 Hz, 1H, H-2''), 3,19 (dd, J = 16,9; 14,0 Hz, 1H, H-3B''), 2,92 (dd, J = 16,9; 2,7 Hz, 1H, H-3A''), -2,57 (sl, 2H, H-21 e H-23).



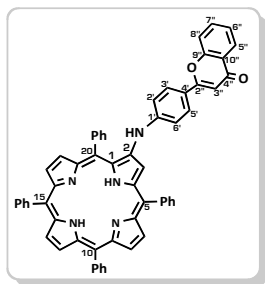
➤ **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (29)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 284 (21), 416 (100), 496 (49), 571 (19), 601 (12); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_2$), [M+H]: 913,2; RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 13,05 (sl, 1H, OH), 8,94-8,86 (m, 5H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,67 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,60 (s, 1H, H-3 $\beta_{\text{pirrónico}}$), 8,22-8,21 (m, 8H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph), 7,97-7,85 (m, 4H, H-6''' e 20-H-*m,p*-Ph), 7,93 (d, J = 15,3 Hz, 1H, H- β), 7,78-7,69 (m, 9H, 5,10,15-H-*m,p*-Ph), 7,63 (d, J = 7,5 Hz, 2H, H-3',5'), 7,56 (d, J = 15,2 Hz, 1H, H- α), 7,53-7,40 (m, 1H, H-4'''), 7,04-6,99 (m, 1H, H-3'' e H-5'''), 6,97 (d, J = 7,5 Hz, 2H, H-2',6'), 6,87 (sl, 1H, NH).



➤ **DÍADE PORFIRINA-FLAVANONA (30)** - UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MÁX.}}$ (%) nm: 309 (12), 414 (100), 569 (11), 496 (4), 615 (3); MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_2$), [M+H]: 913,2; RMN DE ^1H

(300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8,91 (AB, $J = 4,8$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,88 (s, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,86 (AB, $J = 4,7$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,84 (AB, $J = 4,8$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,64 (AB, $J = 4,7$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,50 (s, 1H, H- $3\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,22-8,19 (m, 9H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph e H-5''), 7,93-7,86 (m, 2H, 20-H-*m,p*-Ph), 7,77-7,69 (m, 9H, 5,10,15-H-*m,p*-Ph), 7,51 (ddd, $J = 8,9$; 7,1; 1,7 Hz, 1H, H-7''), 7,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,09-7,02 (m, 2H, H-6'' e H-8''), 7,05 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-2',6'), 6,71 (sl, 1H, NH), 5,40 (dd, $J = 13,4$; 2,8 Hz, 1H, H-2''), 3,11 (dd, $J = 16,9$; 13,4 Hz, 1H, H-3B''), 2,82 (dd, $J = 16,9$; 2,8 Hz, 1H, H-3A'').

2-[4-(4-oxo-4H-cromen-8-il)fenil]amino-5,10,15,20-tetrafenilporfirina - Díade Porfirina-Flavona (31) - A uma solução da Díade Porfirina-Flavona (23) (10,2 mg, 11 μmol) em clorofórmio (4,5 mL) foi adicionado ácido sulfúrico (0,5 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente durante 30 minutos. Findo este período de tempo, verteu-se a reação sobre água e procedeu-se à sua neutralização com uma solução saturada de hidróxido de sódio. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com água destilada, extraída com clorofórmio, seca sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. Por fim, o resíduo obtido foi retomado em clorofórmio, procedendo-se à sua purificação utilizando uma mistura de éter de petróleo e clorofórmio (1:2), tendo-se obtido apenas um composto, o qual foi identificado como sendo a Díade Porfirina-Flavona (31) (8,5 mg, $\eta=89\%$).



➤ **Díade Porfirina-Flavona (31) - UV-Vis (DMF), λ_{MAX} . (Log ϵ) nm:** 306 (4,3), 414 (5,3), 459 (4,8), 523 (4,4), 599 (4,0), 656 (3,5); **MALDI ($\text{C}_{59}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_2$), [M+H]:** 850,3; **RMN DE ^1H (300,13 MHz, CDCl_3), δ ppm:** 8,86 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,82 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,79 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,76 (s, 2H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,62 (AB, $J = 4,9$ Hz, 1H, H- $\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,43 (s, 1H, H- $3\beta_{\text{pirrólico}}$), 8,25-8,17 (m, 9H, 5,10,15,20-H-*o*-Ph e H-5''), 8,00-7,93 (m, 1H, 20-H-*p*-Ph), 7,92-7,87 (m, 2H, 20-H-*m*-Ph), 7,86 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,80-7,73 (m, 9H, 5,10,15-H-*m,p*-Ph), 7,72-7,67 (m, 1H, H-7''), 7,57 (dd, $J = 8,4$, 0,94 Hz, 1H, H-8''), 7,42 (ddd, $J = 8,0$, 7,0, 0,94 Hz, 1H, H-6''), 7,04 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3',5'), 6,82 (sl, 1H, NH), 6,76 (s, 1H, H-3''), -2.63 (sl, 2H, H-21 e H-23).

4.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DAS DÍADES DO TIPO PORFIRINA-FLAVONOIDE

4.3.1. AVALIAÇÃO DA EMISSÃO POR FLUORESCÊNCIA

Para proceder à avaliação da fluorescência das díades porfirina-flavonoide em posição *meso*, utilizaram-se células de fluorescência onde foram preparadas soluções destas díades assim como da porfirina de referência em DMF, com uma densidade ótica de 0,02 a λ 550 nm. Uma vez preparadas as soluções estas foram analisadas num fluorímetro, onde foram registados os respetivos espectros de emissão entre 600-850 nm após excitação a λ_{exc} 550 nm e com um slit de 2 nm. Para as díades porfirina-flavonoide em posição β -pirrólica, foram igualmente preparadas soluções das díades e da porfirina de referência em DMF, com uma densidade ótica de 0,02 mas neste caso a λ 580 nm. Em seguida, estas soluções foram analisadas num fluorímetro tendo-se registados os respetivos espectros de emissão entre 600-850 nm após excitação a λ_{exc} 580 nm e com um slit de 2 nm. Após a obtenção dos espectros de emissão de todos os derivados, as suas áreas foram determinadas recorrendo ao programa Origin 8.0.

4.3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÉNIO SINGULETO

Antes de cada ensaio, foram preparadas duas soluções stock de DFiBF (50 μ M) em DMF. As soluções stock das díades e da TPP foram preparadas em DMF e apresentam concentrações entre 95 μ M - 127 μ M.

Para proceder a este estudo, em células de vidro, foi colocado DMF e o composto em estudo com uma concentração final de 0,5 μ M, sendo em seguida adicionado 50 μ M de DFiBF em um volume final de DMF de 3 mL. As soluções foram em seguida irradiadas com uma fonte de luz composta por 25 LEDs vermelhos de alto brilho (640 ± 20 nm), dispostos num quadrado 5x5 cm e com uma potência de 9,0 mW cm⁻². Durante o tempo de irradiação as soluções foram mantidas sob agitação magnética à temperatura ambiente.

A fotodegradação do DFIBF foi monitorizada por UV-Vis, sendo medido o decaimento da absorvância deste composto a λ 415 nm, em intervalos regulares de 1 minuto.

4.3.3. AVALIAÇÃO DAS DÍADES PORFIRINA-FLAVONOIDE EM POSIÇÃO β -PIRRÓLICA COMPLEXADAS COMO AGENTES INTERCALANTES DE ADN

A solução stock da TMPyP em DMSO, foi fornecida apresentando-se com uma concentração de 500 μ M.

Para as **DÍADE PORFIRINA-CALCONA (20)** e a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONA (23)** ambas em posição β -pirrólica, assim como para os seus precursores (**4-BROMO-2'-HIDROXICALCONA (7)**, **4'-BROMOFLAVONA (8)** e **Ni(II)-NH₂-TPP (15)**), foram preparadas soluções stock em dois solventes distintos (DMF e DMSO), apresentando concentrações entre 500 e 1500 μ M.

As soluções de CT ADN (Calf Thymus), foram conseguidas pela dissolução de 2 mg de CT ADN em 20 mL de uma solução tampão Tris-HCl (5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl em água milli-Q, com pH 7,2). A concentração exata das soluções de ADN preparadas foi determinada por espectrometria de UV-Vis utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 6600 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm. Os valores da razão da absorção a 260 e 280 nm encontram-se dentro dos valores descritos na literatura (1,8-1,9:1), o que permitiu concluir que o ADN presente em solução se encontrava livre de proteínas. As soluções ADN preparadas foram utilizadas por um período máximo de 4 dias, sendo guardadas a uma temperatura de 4 °C entre ensaios.

Para proceder aos estudos de intercalação, em uma célula espectrofotométrica de quartzo contendo solvente (DMF ou DMSO) adicionou-se 9-10 μ M de cada uma das soluções stock, sendo que após homogeneização foram adicionados volumes iguais de CT ADN mantendo-se a solução a uma temperatura de 20 °C e sob agitação magnética durante 10 minutos. Após este período de tempo foram registados num espetofotómetro os espectros de UV-Vis referentes a cada adição de CT ADN.

A título de exemplo, para o ensaio com a TMPyP foi adicionado à célula espectrofotométrica 2,450 mL de DMSO e 50 μ L da solução de stock da **TMPyP (32)**, pelo que após a sua homogeneização foram adicionados volumes iguais e sucessivos de 70 μ L ADN, sendo ao fim de cada 10 minutos registados os respectivos espectros de UV-Vis referentes a cada adição.

| CAPÍTULO 5 | DISCUSSÃO E CONCLUSÃO DOS RESULTADOS

A realização deste trabalho permitiu concluir que a reação de aminação de Buchwald-Hartwig constitui uma ferramenta bastante eficiente na formação de ligações carbono-nitrogênio, tendo sido possível através desta metodologia a síntese das díades porfirina-flavonoide pretendidas. Para além das díades requeridas, na síntese das díades porfirina-calcona foi também possível isolar e caracterizar a díade porfirina-flavanona, quer em posição *meso* quer em posição β -pirrólica. A formação desta díade deve-se à existência de flavanona no meio reacional, a qual surge mediante o equilíbrio existente entre a calcona e a correspondente flavanona. Para contornar o aparecimento desta nova díade seria necessário proceder à proteção prévia do grupo hidroxilo da calcona por forma a evitar a ciclização na sua respetiva flavanona. Na síntese da díade porfirina-flavona em posição *meso* verificou-se a formação de uma tríade, a qual resultou do acoplamento da porfirina com duas flavonas. Contudo, não se observou a formação de tríades na síntese da díade porfirina-flavona em posição β -pirrólica, possivelmente devido ao impedimento estereoquímico existente. No que diz respeito aos rendimentos obtidos na síntese das díades porfirina-flavonoide, foi possível observar que a formação das díades em posição β -pirrólica apresentam rendimentos mais elevados (51 e 91%) do que a síntese das díades em posição *meso* (31 e 65%), o que vai de encontro ao esperado uma vez que as porfirinas quando se encontram complexadas apresentam uma maior reatividade nas posições β -pirrólicas. Foi também possível verificar que a formação das díades porfirina-flavona quando comparada com a formação das díades porfirina-calcona apresenta melhores rendimentos, em ambas as posições.

Pelo estudo das propriedades fotofísicas das díades sintetizadas, observa-se que estas apresentam resultados interessantes, tendo-se verificado que todas as díades, com exceção das díades complexadas com Ni(II), exibem emissão por fluorescência, apresentando as díades porfirina-flavonoide em posição *meso* (24-26) rendimentos quânticos de fluorescência elevados e superiores ao derivado precursor (TPP (9)). Deste modo, estas três díades (24-26) surgem como potenciais candidatos para utilização no fotodiagnóstico. Por outro lado, verificou-se que todas as díades não complexadas apresentam boa capacidade para produzir oxigénio singuleto, pelo que poderão ser consideradas como potenciais fotossensibilizadores para a PDT de tumores. Futuramente,

seria pertinente a síntese de novas díades porfirina-flavonoide recorrendo à utilização de novos flavonoides. Por exemplo, o acoplamento de diferentes flavanonas à porfirina descomplexada em posição *meso* penso que seria uma boa opção uma vez que se verificou que a **DÍADE PORFIRINA-FLAVONONA (26)** apresenta boa emissão por fluorescência assim como uma boa capacidade em produzir oxigénio singuleto, sendo estas duas das características mais importantes exigidas pela terapia fotodinâmica.

No que diz respeito aos estudos de intercalação de ADN, podemos considerar que os resultados obtidos foram inconclusivos uma vez que não foi possível determinar com exatidão se as díades estudadas intercalam com o ADN, sendo necessário a realização de novos estudos que confirmem realmente a existência ou não da interação com o ADN. Futuramente, para além da utilização de novos flavonoides seria pertinente adicionar grupos polares ou grupos carregados positivamente por forma a contornar os problemas de solubilidade das díades em soluções aquosas, o que seria de facto bastante importante uma vez que a potencial aplicação destes compostos será em sistemas biológicos.

Atendendo a que os resultados obtidos se revelaram promissores, no que respeita às propriedades fotofísicas das díades sintetizadas, futuramente seria pertinente a realização de testes *in vivo* por forma a viabilizar a sua aplicação em sistemas biológicos.

| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS |

- [1] - Geleijnse, J. M.; Hollman, P. C. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, 88, 12-13.
- [2] - Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 74, 418-425.
- [3] - Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2005**, 26, 343-356.
- [4] - Buer, C. S.; Imin, N.; Djordjevic, M. A. *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, 52, 98-111.
- [5] - Martens, S.; Mithöfer, A. *Phytochemistry* **2005**, 66, 2399-2407.
- [6] - Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52, 673-751.
- [7] - Kodan, A.; Kuroda, H.; Sakai, F. *Tree Physiol.* **2009**, 99, 3335.
- [9] - Fliegmann, J.; Furtwängler, K.; Malterer, G.; Cantarello, C.; Schüler, G. D.; Ebel, J. R.; Mithöfer, A. *Phytochemistry* **2010**, 71, 508-514.
- [9] - Verma, A. K.; Pratap, R. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 1571-1593.
- [10] - Hoffmann, D. *Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine* **2003**, Rochester, Healing Arts Press.
- [11] - Grotewold, E. *The Science of Flavonoids* **2007**, Ohio, Springer.
- [12] - Amado, N. I. G.; Fonseca, B. R. F.; Cerqueira, D. B. M.; Neto, V. M.; Abreu, J. G. *Life Sci.* **2011**, 89, 545-554.
- [13] - Prasain, J. K.; Wang, C. C.; Barnes, S. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, 3, 1324-1350.
- [14] - Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, 33, 1887.
- [15] - Veitch, N. C.; Grayer, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 555-611.
- [16] - Havsteen, B. H. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 96, 67-202.
- [17] - Williams, C. A.; Grayer, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 539-573.
- [18] - Yang, F.; Zhao, Y.; Kai, G.; Xiao, J. *Food Funct.* **2011**, 2, 137-141.
- [19] - Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet* **2006**, Oxford, Blackwell Publishing.
- [20] - Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomás-Barberán, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. *Plant Food Hum. Nutr.* **2004**, 59, 113-122.
- [21] - Malešev, D.; Kuntiće, V. J. *Serb. Chem. Soc.* **2007**, 72, 921-939.

- [22] - Pinto, R. M. M. S. *Contribuição para o estudo de compostos flavónicos em espécies de Hypericum da flora portuguesa*, **1987**, Tese de Doutoramento da Faculdade de Farmácia de Universidade do Porto.
- [23] - Stark, T.; Keller, D.; Wenker, K.; Hillmann, H.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 9685.
- [24] - Kawai, Y.; Ishisaka, A.; Saito, S.; Uchida, K.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Fukuchi, Y.; Naito, M.; Terao, J. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 476, 124.
- [25] - Spencer, J. P. E. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 1152-1161.
- [26] - Shukla, S.; Gupta, S. *Pharmaceut. Res.* **2010**, 27, 962.
- [27] - Glauert, H. P.; Calfee-Mason, K.; Stemm, D. N.; Tharappel, J. C.; Spear, B. T. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, 54, 875.
- [28] - Modak, B.; Contreras, M. L.; Nilo-González, F.; Torres, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 309.
- [29] - Foroumadi, A.; Samzadeh-Kermani, A.; Emami, S.; Dehghan, G.; Sorkhi, M.; Arabsorkhi, F.; Heidari, M. R.; Abdollahi, M.; Shafiee, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 6764-6769.
- [30] - Herrerias, T.; Oliveira, O. B.; Gomes, M. A. B.; Oliveira, M. B. M.; Carnieri, E. G. S.; Cadena, S. M. S. C.; Martinez, G. R.; Rocha, M. E. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 16, 854.
- [31] - Spencer, J. *Genes Nutr.* **2009**, 4, 243-250.
- [32] - Depeint, F.; Gee, J.; Williamson, G.; Johnson, I. *Proc. Nutr. Soc.* **2002**, 61, 97.
- [33] - Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 519-534.
- [34] - Vieira, J. S. *2-Estirilcromonas síntese, bromação e transformação em triazóis* **2000**, Tese de Mestrado da Universidade de Aveiro.
- [35] - Pinto, D. C. G. A. *2-Estirilcromonas: Síntese, Caracterização Estrutural e Transformações em Pirazóis*, **1996**, Tese de Doutoramento da Universidade de Aveiro.
- [36] - Patoilo, D. T. *Síntese e transformações de Diels-Alder de 2-estirilcromonas: síntese de flavonas contendo unidades do tipo pirimidina*, **2005**, Tese de Doutoramento da Universidade de Aveiro.
- [37] - Santos, C. M. M. *Transformações de cetonas α , β e α , β , σ , δ -insaturadas. Novas rotas de síntese de 2,3-diarilxantonas*, **2007**, Tese de Doutoramento da Universidade de Aveiro.
- [38] - Senge, M. O.; Shaker, Y. M.; Pinteá, M.; Ryppa, C.; Hatscher, S. S.; Ryan, A.; Sergeeva, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 237-258.
- [39] - http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1930/fischer-lecture.pdf, acedido em 10 de Novembro 2011.

- [40] - Milgrom L. R. *The Colours of Life* **1997**, Oxford, Oxford University Press.
- [41] - Manso, C.; Freira, A.; Azevedo, M. *Introdução à bioquímica humana* **1986**, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- [42] - Serra, V. I. R. C. V. *Novos derivados porfirínicos: síntese e potenciais aplicações na detecção de neoplasias*, **2005**, Tese de Mestrado da Universidade de Aveiro.
- [43] - Moss, G. P. *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 779.
- [44] - Jaquinod, L. *Functionalization of 5,10,15,20-Tetra-Substituted Porphyrins* em *The Porphyrin Handbook – Synthesis and Organic Chemistry* editado por K. M. Kadish, K. M. Smith e R. Guillard **2000**, Vol. 1., San Diego, Academic Press.
- [45] - Scheer, H.; Katz, J. J. *Porphyrins and Metalloporphyrins* editado por Smith, K. M. **1975**, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company.
- [46] - Steiner, E.; Soncini, A.; Fowler, P. W. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4053-4059.
- [47] - De Paula, R. *Novos derivados porfirínicos: síntese e avaliação de propriedades catalíticas*, **2009**, Tese de Doutorado da Universidade de Aveiro.
- [48] - Lacerda, P. S. S. *Síntese de novos macrociclos tetrapirrólicos*, **2007**, Tese de Doutorado da Universidade de Aveiro.
- [49] - Pandey, R. K.; Zheng, G. *Porphyrin as Photosensitizer in PDT* em *The Porphyrin Handbook – Applications: Past, Present and Future* editado por Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. **2000**, Vol. 6, San Diego, Academic Press.
- [50] - Bouamaied, I.; Coskun, T.; Stulz, E. *Axial Coordination to Metalloporphyrins Leading to Multinuclear Assemblies* em *Non-covalent multi-porphyrin assemblies: synthesis and properties* editado por Alessio, E. **2006**, Vol. 121, Virginia, Springer.
- [51] - Kimura, M.; Shirai, H. *Enzyme-Like Catalytic Reactions of Metallophthalocyanines and Polymeric Metallophthalocyanines* em *The Porphyrin Handbook - Applications of Phthalocyanines* editado por Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. **2003**, Vol. 19, New York, Academic Press.
- [52] - Simonneaux, G.; Le Maux, P.; Ferrand, Y.; Rault-Berthelot, J. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 2212.
- [53] - Alstrum-Azevedo, J. H.; Brennaman, M. K.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 6802-6827.
- [54] - Lee, S. J.; Hupp, J. T. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 1710.
- [55] - Arunkumar, C.; Bhyrappa, P.; Varghese, B. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 8033.
- [56] - Imahori, H.; Fukuzumi, S. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, 14, 525.

- [57] - Komatsu, T.; Ohmichi, N.; Nakagawa, A.; Zunszain, P. A.; Curry, S.; Tsuchida, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 15933.
- [58] - Trannoy, L. L.; Lagerberg, J. W. M.; Dubbelman, T. M. A. R.; Schuitmaker, H. J.; Brand, A. *Transfusion* **2004**, 44, 1186.
- [59] - Banfi, S.; Carusco, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbiery, P.; Orlandi, V. *J. Photochem. Photobiol.* **2006**, 85, 28-38.
- [60] - Almeida, A.; Cunha, A.; Faustino, M. A. F.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S. *Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents em Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications* editado por Hamblin, M. R.; Jori, G. **2011**, London, Royal Society of Chemistry.
- [61] - Fisher, A. M. R.; Murphee, A. L.; Gomer, C. J. *Laser Surg. Med.* **1995**, 17, 2.
- [62] - Trauner, K. B.; Hasan, T. *Photochem. Photobiol.* **1996**, 64, 740.
- [63] - Jori, G.; Bock, G.; Hamett, S. *Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use* **1989**, Chichester, John Wiley & Sons.
- [64] - Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.; Childs, C. J. H.; Sibata, C. H. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, 1, 27-42.
- [65] - Bonnett, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy* **2000**, London, Gordon e Breach Science Publishers.
- [66] - Serra, V. V.; Zamarrón, A.; Faustino, M. A. F.; Cruz, M. C. I.; Blázquez, A.; Rodrigues, J. M. M.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Juarranz, A.; Sanz-Rodríguez, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 18, 6170-6178.
- [67] - Rothmund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 2010.
- [68] - Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 476.
- [69] - Gonsalves, A. M. R.; Pereira, M. M. J. *Heterocycl. Chem.* **1985**, 22, 931.
- [70] - Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 827.
- [71] - Gonsalves, A. M. R.; Varejão, J. M. T. B.; Pereira, M. M. J. *Heterocycl. Chem.* **1991**, 28, 635.
- [72] - De Paula, R.; Faustino, M. A. F.; Pinto, D. C. G. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, 45, 453.
- [73] - Sousa, R. M. S.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S.; Serra, V. V.; Barros, A. I. R. N. A.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 132-143.

- [74] - Ahmed, N.; Dubuc, C.; Rousseau, J.; Bénard, F.; van Lier, J. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3212-3216.
- [75] - Enes R. F.; Farinha A. S. F.; Tomé A. C.; Cavaleiro J. A. S.; Amorati R.; Petrucci S.; Pedulli G. F. *Tetrahedron* **2009**, 65, 253-262.
- [76] - Serra, V. V.; Camões, F.; Vieira, S. I.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Pinto, D. C. G. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé A.C.; Silva, A. M. S.; Silva, E. F. C.; Cavaleiro, J. A. S. *Acta Chim. Slov.* **2009**, 56, 603-611.
- [77] - Guram, A. S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1348.
- [78] - Louie, J.; Hartwig, J. F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3609.
- [79] - Driver, M. S.; Hartwig, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7217.
- [80] - Wolfe, J. P.; Wagaw, S.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7215.
- [81] - Pereira, A. M. V. M. *Síntese de novos derivados tetrapirrólicos*, **2005**, Tese de Mestrado da Universidade de Aveiro.
- [82] - Zhao, P.; Xu, L-C.; Huang, J-W.; Liu, J.; Yu, H-C.; Zheng, K-C.; Ji, L-N. *Spectrochim. Acta Part A* **2008**, 71, 1216-1223.
- [83] - Sternberg, E. D.; Dolphin, D. *Tetrahedron* **1998**, 54, 4151-4202.
- [84] - Tavares, A.; Dias, S. R. S.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Gomes, N. C. M.; Alves, E.; Almeida, A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, 10, 1659.
- [85] - Moura, N. M. M.; Giuntini, F.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Rakib, E. M.; Hannioui, A.; Abouricha, S.; Röder, B.; Cavaleiro, J. A.S. *Arkivoc* **2010**, 5, 24-33.
- [86] - Moura, N. M. M.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Rakib, E. M.; Hannioui, A.; Mojahidi, S.; Hackbarth, S.; Röder, B.; Paz, F. A. A.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron* **2012**, 68, 8181 - 8193.
- [87] - Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Gonsalves, A.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 2299.
- [88] - DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 233, 351-371.
- [89] - Howard, J. A.; Mendenhall, G. D. *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 2199.
- [90] - Gomes, A. T. P. C.; Cunha, A. C.; Domingues, M. R.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Santos, F. S.; Souza, M. C. B. V.; Ferreira V. F.; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron* **2011**, 7336-7342.
- [91] - Perveen, F.; Qureshi, R.; Ansari, F. L.; Kalsoom, S.; Ahmed, S. *J. Mol. Struct.* **2011**, 67-73.

- [92] - Queiroz, M-J. R. P.; Castanheira, E. M. S.; Carvalho, M. S. D.; Abreu, A. S.; Ferreira, P. M. T.; Karadeniz, H.; Erdem, A. *Tetrahedron* **2008**, 64, 382-391.
- [93] - Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* **2008**, Amesterdão, Elsevier.
- [94] - Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Villafranca, J. J. *Biochemistry* **1983**, 22, 5409-5417.
- [95] - Verchere-Beaur, C.; Perree-Fauvet, M.; Tarnaud, E.; Anneheim-Herbelin, G.; Bone, N.; Gaudemer, A. *Tetrahedron* **1996**, 52, 13589-13604.
- [96] - Liu, H.-K.; Sadler, P. J. *Acc. Chem. Rev.* **2011**, 44, 349-359.
- [97] - Duval, H.; Bulach, V.; Fischer, J.; Weiss, R. *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 5495-5501.
- [98] - Schotanus, M. P.; Aumann, K. S.; Sinniah, K. *Langmuir* **2002**, 18, 5333-5336.
- [99] - Mettath, S.; Munson, B. R.; Pandey, R. K. *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 94-102.
- [100] - Hong, S.; Huh, S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, 24, 137.
- [101] - Schmid, F.-X. *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry* **2001**, Bayreuth, John Wiley & Sons.